

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA  
DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA  
**Dottorato in**  
**Sanità Pubblica e Medicina Preventiva**

XXX ciclo

**"Remediation Technologies for environmental contamination by  
PAHs: Microbial Fuel Cells"**

**Edvige Gambino**

**Coordinatore**

Prof. Stefania Montagnani

**Tutor**

Prof. Marco Guida

**Anno Accademico 2017-2018**

# INDICE

<b>1.INTRODUZIONE.....</b>	<b>5</b>
1.1 CARATTERISTICHE IPA.....	5
1.1.1 Generalità.....	5
1.1.2 Fonti degli IPA.....	8
1.1.3 Distribuzione nell' Ambiente.....	9
1.1.4 Degradazione microbica degli IPA .....	11
1.1.5 Tossicità e Cancerogenicità .....	17
1.2 TECNICHE DI BONIFICA.....	24
1.2.1 Metodi chimico-fisici.....	26
1.2.2 Metodi Termici .....	27
1.2.3 Metodi Biologici .....	28
1.3 MICROBIAL FUEL CELL (MFC) .....	37
1.3.1 Principio di funzionamento MFC .....	38
1.3.2. Efficienza delle MFCs .....	43
1.3.3 Tipologia di MFC .....	45
1.3.4 Applicazione MFC in bioremediation.....	48
 <b>2. SCOPO DELLA RICERCA .....</b>	 <b>50</b>
 <b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	 <b>53</b>
3.1 OBIETTIVO 1 .....	53
3.1.1 IPA utilizzati .....	53
3.1.2 Isolamento ed identificazione consorzio microbico.....	63
3.1.3 Estrazione DNA e PCR.....	63
3.1.4 Test di degradazione in vitro.....	64
3.1.5 Allestimento sistema modello .....	67
3.1.6 Analisi microbiologiche .....	71
3.1.7 Monitoraggio performances MFCs.....	72
3.1.8 Analisi chimiche .....	75
3.1.8.1 Determinazione IPA .....	75
3.1.8.2 Determinazione del COD e TOC .....	80
3.1.9 Analisi ecotossicologiche.....	81

3.2. OBIETTIVO 2 .....	85
3.2.1 Sediment Microbial Fuel Cell (SMFC).....	85
3.2.2 Identificazione molecolare da sedimenti marini .....	87
3.2.3 Analisi microbiologiche .....	88
3.2.4 Monitoraggio delle SMFCs.....	89
3.2.5 Analisi chimiche .....	90
3.2.6 Saggi ecotossicologici.....	94
 <b>4. RISULTATI e DISCUSSIONI.....</b>	<b>98</b>
4.1 OBIETTIVO1 .....	98
4.1.1 Identificazione molecolare e test di degradazione in vitro.....	98
4.1.2 Composizione comunità microbica.....	100
4.1.3 Performances delle MFCs.....	101
4.1.4 Analisi chimiche .....	104
4.1.5 Risultati dei saggi di tossità con <i>Raphidocelis subcapitata</i> .....	111
4.1.6 Confronto consorzio specializzato e consorzio endogeno .....	113
4.2. OBIETTIVO 2 .....	115
4.2.1 Identificazione ceppi marini.....	115
4.2.2 Analisi microbiologiche .....	116
4.2.3 Performances delle SMFCs.....	117
4.2.4 Analisi chimiche .....	118
4.2.5 Analisi ecotossicologiche con <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	122
 <b>5. CONCLUSIONI.....</b>	<b>124</b>
 <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>125</b>

# 1.INTRODUZIONE

La contaminazione dei suoli, delle acque freatiche, dei sedimenti, delle acque superficiali e dell'aria è uno dei maggiori problemi a cui sta andando incontro il mondo industrializzato. Negli ultimi decenni ci sono stati diversi avvenimenti significativi, collegati a spargimenti di petrolio in ambienti marini e terrestri, strettamente associati ad attività antropogeniche. Gli idrocarburi, sono ampiamente utilizzati come combustibili fossili e nella produzione di numerosi prodotti petrolchimici ed hanno contribuito immensamente all'economia globale e all'industrializzazione. Purtroppo, l'uso diffuso di idrocarburi petroliferi ha aumentato i livelli di inquinamento ambientale derivanti da perdite, smaltimento indiscriminato e fuoriuscite accidentali.

Tra gli idrocarburi, quelli policiclici aromatici (IPA) sono al centro di grande attenzione da parte della comunità scientifica a causa delle loro proprietà cancerogene e mutagene nonché della loro lipofilità e bassa solubilità nell'acqua (1) che contribuisce alla loro elevata persistenza ambientale. Inoltre, a causa delle loro proprietà, possono essere bioaccumulati in piante e animali tramite biomagnificazione lungo le catene alimentari. (2). Gli IPA sono comunemente rilevati in aria, suolo e acqua e sono considerati onnipresenti nell'ambiente (3). L'inquinamento causato da tali composti si traduce in un deterioramento acuto degli ambienti marini, delle acque sotterranee e del suolo (4). Difatti, 16 di questi composti sono stati classificati dall' US Environmental Protection Agency (US-EPA) come tossici, mutageni ed elencati tra gli inquinanti prioritari a causa del rischio significativo per l'ambiente dovuto loro persistenza, bioaccumulo e tossicità. Quindi l'inquinamento ambientale da IPA è un problema sempre più attuale e rappresenta una difficile sfida nell'ambito dei processi di risanamento. Infatti, la soluzione di tale problematica richiede lo studio di nuove e più adeguate tecnologie sia per ridurre i tassi d'inquinamento, sia per trovare rimedio ai danni recati all'ambiente.

La maggior parte dei processi di bonifica sono costosi, inefficaci, troppo lenti o non rispettosi dell'ambiente. In questa ottica, i trattamenti di bioremediation sono considerati più efficaci, accessibili, sicuri e con un disturbo dell'ambiente inferiore rispetto agli approcci chimici e tecnici fisici. Nel corso degli anni, i processi di bonifica a base biologica hanno dimostrato la loro efficienza nella rimozione degli idrocarburi, con risultati incoraggianti(5). Recentemente, la ricerca sulla bioremediation ha incontrato la tecnologia delle celle a combustibile microbica (MFC) e, più in generale, nei sistemi bioelettrochimici (BES). Questi sistemi hanno attirato molta l'attenzione vista la loro ecocompatibilità con l'ambiente, versatilità e produzione di prodotti utili (ad esempio elettricità, combustibili e prodotti chimici). Inoltre la tecnologia emergente delle Microbial Fuel Cell (MFC), sta dando risultati promettenti ad esempio nell'ambito dell'inquinamento dei sedimenti marini e acqua contaminati da IPA(6;7)

## **1.1 CARATTERISTICHE IPA**

### **1.1.1 Generalità**

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) rappresentano una delle più importanti classi di composti chimici tra i quali ci sono alcuni elementi che hanno dimostrato azione cancerogena. Per tale motivo vi è una forte attenzione allo sviluppo di metodi di identificazione e successiva quantificazione degli idrocarburi policiclici aromatici in varie matrici ambientali. La caratteristica strutturale degli IPA è la presenza di due o più anelli benzenici uniti tra loro. Sono noti IPA con un numero d'anelli variabile da 2 a 7 che, secondo la posizione in cui è avvenuta la condensazione, si presentano sotto forma di diversi isomeri. Il numero di tali anelli ne determina le caratteristiche chimiche e chimico – fisiche, nonché tossicologiche.

La numerosità della famiglia cresce considerando la possibile presenza di sostituenti (alchile, arile, idrossi, nitro, amino) sugli anelli aromatici e/o eteroatomi negli anelli stessi. Sono

usualmente suddivisi in funzione del peso molecolare e del numero d'atomi che comprendono IPA leggeri (2-3 anelli condensati) e IPA pesanti (4-6 anelli).

Gli idrocarburi aromatici policiclici si presentano, a temperatura ambiente, allo stato solido incolori, bianchi o gialli pallidi. A seconda della loro pressione di vapore, i composti si trovano allo stato gassoso o condensato sulla superficie di particelle. Composti come il naftalene ed il fenantrene (pressione di vapore  $> 10^{-2}$  torr) si trovano in fase gassosa, mentre altri composti quali il benzo[a]pirene (pressione di vapore  $< 10^{-6}$  torr) si trovano in fase condensata sulla superficie delle particelle. Inoltre hanno elevati valori di fusione e punto di ebollizione (quindi solidi), bassa pressione vapore e solubilità acquosa molto bassa (3), che li rende poco solubili o del tutto insolubili in acqua. In genere la solubilità in acqua e la pressione vapore (influenza le differenti percentuali con cui i singoli IPA sono assorbiti sul particolato atmosferico) tendono a diminuire con l'aumentare del peso molecolare (8). Il naftalene, ad esempio, è il componente con tensione di vapore più elevata ed è anche il più idrosolubile, la sua solubilità in acqua è sull'ordine delle decine di mg/l (31,7 mg/l), il fenantrene ha tre anelli benzenici e presenta una solubilità in acqua di circa 1,3 mg/l, il pirene, quattro anelli condensati, di 0.13 mg/l, mentre i componenti a cinque e a sei anelli benzenici la solubilità scende al livello di qualche microgrammo litro. Ciò influenza la distribuzione a l'accumulo di IPA nelle matrici ambientali. Nei sedimenti fluviali e marini gli IPA meno idrosolubili presentano maggiormente il fenomeno dell'accumulo, invece quelli con maggior solubilità, solubilizzano nella colonna d'acqua (ritrovandoli così nei mitili e/o nei pesci). I punti di ebollizione e di fusione elevati, influenzano le differenti percentuali con cui i singoli IPA sono assorbiti sul particolato atmosferico

Al contrario, gli IPA sono solubili nella maggioranza dei solventi organici e risultano lipofilici. Questa ultima caratteristica è data dal coefficiente di ripartizione acqua/ottanolo ( $K_{ow}$ ), che esprime la capacità dei composti di attraversare la membrana cellulare e di accumularsi in fasi

apolari quali ad esempio i tessuti lipidici degli organismi (caratteristica che aumenta con l'aumentare del numero degli anelli benzenici fusi e quindi del peso molecolare (9)). A causa di tale proprietà gli IPA tendono ad bioaccumolarsi, ciò viene espresso dal fattore di bioconcentrazione (BCF biological concentration factor) dato da:  $BCF = C_f/C_w$ , ( $C_f$  e  $C_w$  rappresentano le concentrazioni di una determinata sostanza nel tessuto dell'organismo e nell'acqua in cui vive).

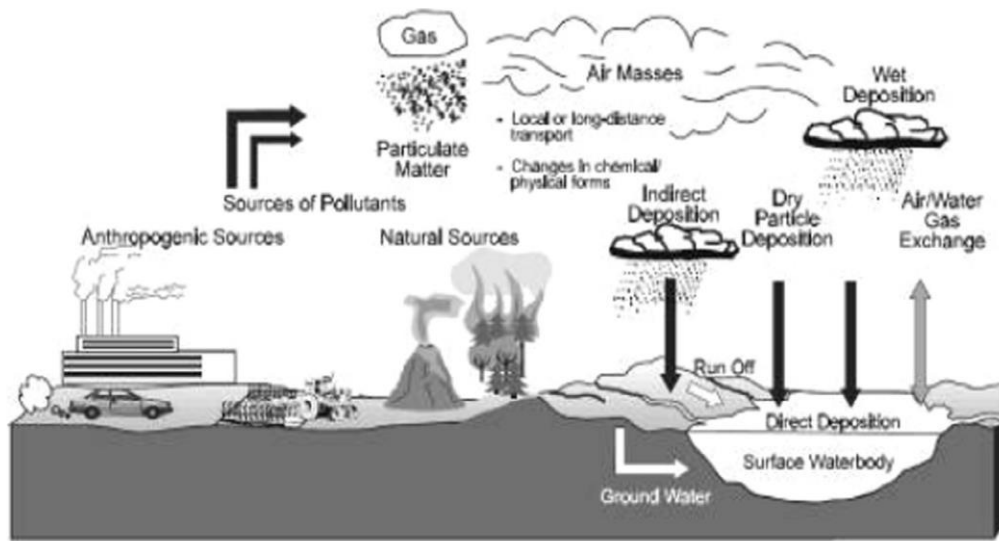
Inoltre gli IPA manifestano sensibilità alla luce, resistenza al calore, conduttività e resistenza alla corrosione(10).

Gli IPA dispongono di spettri di assorbanza UV molto caratteristici. Ogni struttura ad anello ha uno spettro UV unico ciò è particolarmente utile nell'identificazione degli IPA.

Gli IPA sono chimicamente piuttosto stabili, sebbene in seguito a foto-decomposizione, in presenza d'aria e luce, danno luogo a molti prodotti d'ossidazione, soprattutto chinoni ed endoperossidi (11).

Tra gli IPA il benzo(a)pirenen è stato inserito, dall' Agenzia EPA, tra i composti cancerogeni e neurotossici. La contaminazione delle acque sotterranee e sedimenti in cui è presente anche questo composto è difficile da rimediare perché moderatamente solubili in acqua (solubilità di benzene in acqua = 1780 mg L<sup>-1</sup> a temperatura ambiente), può diffondersi rapidamente (7) oltre ad essere un composto molto recalcitrante (12.)

### 1.1.2 Fonti degli IPA



Source: U.S. EPA 2000

Fig. 1.1.2. 1: Fonti degli IPA

Gli IPA si formano durante i processi di combustione incompleta di combustibili fossili come carboni e petroli, nella combustione della biomassa, dalle emissioni del traffico veicolare (13). Sono presenti anche nei cicli produttivi che impiegano materie prime che li contengono (pece, carbon fossile, bitumi, ecc..).

Le fonti di IPA in ambiente sono, quindi, sia naturali che antropiche. Per fonti naturali, gli IPA si formano in seguito a processi di pirolisi ad alta temperatura di materiali organici (incendi di foreste, eruzioni vulcaniche), essudati degli alberi e biosintesi diretta da parte di microrganismi e piante.

Invece tra le principali fonti antropiche è possibile annoverare gli spargimenti accidentali, smaltimento improprio dei prodotti petroliferi, scarichi industriali, riscaldamento residenziale, la produzione di asfalto, emissione veicolare, lavorazioni del carbone e del petrolio, fumo di sigaretti e cibi affumicati (14). Quindi le fonti degli IPA all'ambiente sono numerose e generalmente ben note.



Inoltre, ci sono alcuni usi commerciali per molti IPA. Sono utilizzati principalmente come intermediari in prodotti farmaceutici, prodotti agricoli, prodotti fotografici, plastica termoisolante, materiali lubrificanti e altre industrie chimiche (15). Ad esempio l'antracene usato nei diluenti per conservanti di legno e produzione di coloranti e pigmenti o il fenantrene nella produzione di resine e pesticidi.

Di conseguenza gli IPA sono inquinanti ubiquitari e possono essere ritrovati, ad esempio, nei terreni esposti, nei sedimenti marini e fluviali, nelle acque sotterranee, nell'atmosfera, negli organismi bentonici, nei prodotti vegetali.

### 1.1.3 Distribuzione nell' Ambiente

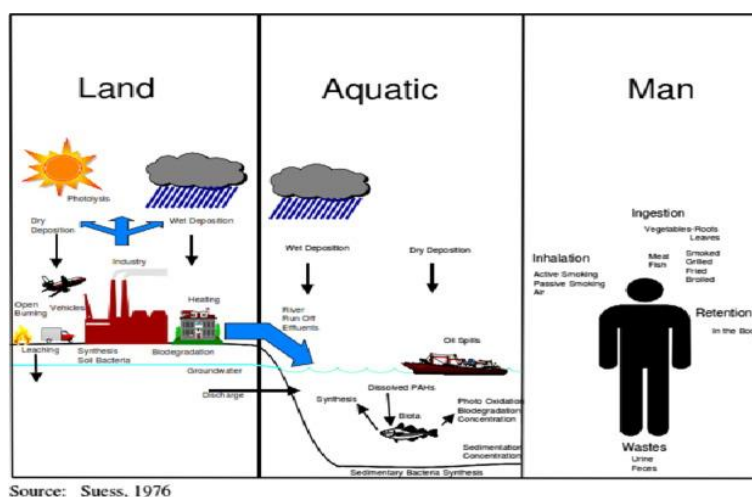


Fig.1.1.3. 1: Distribuzione degli IPA nell' ambiente

Gli IPA sono stati individuati in una grande varietà di comparti ambientali, tra cui aria, acqua (16), cibo (17), suolo e sedimenti (18). Nel suolo e nei sedimenti tendono ad accumularsi maggiormente, data la loro scarsa solubilità in acqua e la loro natura idrofobica.

Una volta immessi nell'atmosfera, gli IPA possono presentarsi in fase gassosa o sotto forma di aerosol. La ripartizione in atmosfera degli IPA tra le particelle e le fasi gassose influenza fortemente il loro trasporto. Il destino degli IPA, adsorbiti sulle particelle, dipende dalle

reazioni a cui possono andare incontro (ad es. fotodegradazioni) e dalle dimensioni delle particelle stesse.

Il meccanismo di precipitazione al suolo o in mare delle particelle dipende dalle dimensioni delle stesse. A seconda del tipo di contributo dato alla precipitazione, dai diversi agenti atmosferici, si può avere una “dry deposition” (precipitazione gravitazionale, diffusione) o una “wet deposition” (neve, nebbia, pioggia), ciò è fortemente influenzato dalla loro partizione di gas / particelle. Gli IPA adsorbiti sulle particelle raggiungono la superficie terrestre, cadendo sul suolo o su un bacino acquifero, mentre gli IPA presenti in atmosfera in fase gassosa, nella zona di interfaccia aria-acqua, si ripartiscono tra le due fasi secondo il coefficiente di trasferimento aria/acqua. Il fattore responsabile della incorporazione degli IPA nei sedimenti, è la sedimentazione del materiale sospeso. La dispersione dipende da fattori quali la solubilità in acqua, la velocità di degradazione ed i fenomeni di risospensione di sedimenti inquinati.

Nell’ atmosfera, gli IPA a quattro anelli, o un numero inferiore, in genere rimangono in forma gassosa quando vengono immessi nell’atmosfera. Dopo aver stazionato meno di 24 ore nell’aria esterna, di solito vengono degradati attraverso una sequenza di reazioni radicaliche che hanno inizio con l’aggiunta di un radicale OH. Al contrario gli IPA con più di 4 anelli non permangono a lungo nell’atmosfera, ma tendono a venire adsorbiti su particelle di fuliggine o di cenere. Quindi gli IPA possono penetrare nei polmoni mediante la respirazione.

Nell’ acqua, gli IPA sono generati, in quantità notevole, dalla produzione di distillati del catrame di carbone, come il cresoto, un conservante del legno (18). Gli IPA derivano anche dalla fuoriuscita del petrolio dalle petroliere, dalle raffinerie, e dai punti di trivellazione del petrolio in mare aperto e dal meccanismo di precipitazione.

Nel suolo, gli IPA possono essere dilavati dall’acqua piovana o, se in forma fluida e permeabile con l’acqua, percolare direttamente verso il basso, spesso fino alla falda acquifera, trascinati o

disciolti in essa; adsorbite alle particelle di suolo; assorbite dalla flora e quindi trasportate ai più alti livelli della catena alimentare, fino all'uomo.

Gli IPA, nei sedimenti, vengono depositati mediante processi simili a quelli che regolano la deposizione su terreni superficiali. Nelle zone rurali, gli IPA presenti nell'atmosfera possono depositarsi sulla superficie di laghi, fiumi e mari mediante processi di deposizione a secco o umido. In seguito vengono dispersi dalle correnti e, infine, si integrano con il sedimento. D'altra parte, i sedimenti, nei pressi di centri urbani, sono influenzati dalla deposizione atmosferica di IPA. Inoltre gli IPA, possono raggiungere i sedimenti anche tramite effluenti di fognatura sanitaria e deflusso stradale. Gli IPA, a causa della loro idrofobicità, si associano rapidamente a sedimenti. La capacità del sedimento di trattenere questi composti può essere correlata a proprietà fisico-chimiche come la dimensione del grano e la materia organica(19). Una volta che gli IPA sono incorporati nei sedimenti, essi sono poco mobili a causa delle loro strutture non polari. Però gli IPA non sono completamente insolubili, come quelli a basso peso molecolare, di conseguenza piccole quantità di IPA si possono dissolvere e venir incluse nell'acqua interstiziale dove diventano biodisponibili. La presenza di colloidali organici nell' acqua interstiziale può aumentare le concentrazioni degli IPA oltre che la loro solubilità acquosa e mobilità nei sedimenti. (20).

#### **1.1.4. Degradazione microbica degli IPA**

La biodegradazione indica i processi biochimici, attuati da diversi organismi, che portano alla riduzione di molecole organiche complesse in costituenti via via più semplici arrivando anche alla formazione di specie inorganiche come acqua, biossido di carbonio, ammonio e nitrati (processo di mineralizzazione). Le comunità microbiche possono degradare una grande varietà di composti sintetici e probabilmente tutte le sostanze naturali.

Gli IPA, introdotti in ambiente, possono andare incontro a processi di degradazione microbica che risultano essere quelli più efficaci (21). In quanto, visto che gli IPA sono prodotti anche da fonti naturali e quindi presenti da tempo nell'ambiente, i microrganismi hanno sviluppato delle vie metaboliche per la loro degradazione.

La maggioranza dei microrganismi, in grado di degradare gli IPA, necessitano di una superficie solida su cui aderire, pertanto suoli e sedimenti sono la matrice in cui può avvenire la degradazione microbica degli IPA (22).

Nelle varie matrici ambientali non vengono ritrovati singoli IPA ma loro miscele che risultano pericolose e difficili da abbattere (23). Singoli ceppi batterici degradano difficilmente miscele complesse di IPA. Per tanto, per la biodegradazione di tali composti, si utilizzano “consorzi” batterici così da sfruttare le capacità degradative complementari dei singoli organismi (24).

Le specie *Pseudomonas* e *Acinetobacter* sono tra le più comuni idrocarburi-degradanti riportati in letteratura (25). La *Pseudomonas putida* è la specie batterica più studiata per la degradazione degli IPA leggeri come il naftalene. Infatti la sequenza biochimica della degradazione di naftalene, da parte di questo batterio, è stata descritta già negli anni 60' (26). Altri gruppi batterici tipici, già noti per la loro capacità di degradare idrocarburi, includono *Micrococcus*, *Mycobacterium* (studiati nella degradazione degli IPA da 4 anelli in su, sono in grado di usarli come fonte di energia, (27)) *Brevibacterium*, *Marinobacter*, *Alcanivorax*, e *Sphingomonas* (risulta capace di degradare IPA da 4 anelli in su come il benzo(a)antracene) (28)) e alcune altre specie di proteobatterie (29).

Le vie metaboliche, a cui gli IPA possono andare incontro, possono essere:

- detossificazione: via metabolica finalizzata alla trasformazione del composto in una forma meno pericolosa o più facilmente rimovibile, senza utilizzarlo come fonte di energia o carbonio;

- catabolismo: utilizzo dei composti come fonte di carbonio ed energia;
- cometabolismo: il contaminante è ridotto da un enzima o da un cofattore prodotto durante il metabolismo microbico di un altro composto. Quindi il composto organico viene trasformato, da parte di un microorganismo, che però è incapace di usarlo come fonte di energia. Il composto, detto substrato secondario, è quindi coinvolto in processi metabolici predisposti per un altro substrato. Frequentemente i derivati dei processi cometabolici possono diventare substrati di crescita per altri batteri. Ciò non produce alcun beneficio energetico o di crescita al microorganismo che media la reazione di processo cometabolare (30). Molti degli IPA pesanti possono essere degradati attraverso processi cometabolici.

In particolare, gli IPA possono essere degradati sia in condizioni aerobiche (9) che anaerobiche (31). Questo dipende dalle condizioni redox, in cui si trovano i batteri, e dall' accettore di elettroni maggiormente disponibile nell' ambiente:

- la respirazione aerobica, con accettore di elettroni l'ossigeno molecolare, assicura una degradazione più veloce e completa degli IPA, però la disponibilità dell'ossigeno in acque e sedimenti, rispetto ad accettori alternativi, è un serio fattore limitante
- la respirazione anaerobica con accettore di elettroni altri ioni ossidanti
- la fermentazione, sempre in anaerobiosi, dove non è presente alcun accettore di elettroni esterno e le reazioni non comportano alcuna variazione dello stato redox complessivo. (32).

Nel caso del metabolismo aerobico, batteri innescano il catabolismo degli IPA attraverso l'azione delle ossigenasi batteriche. Le ossigenasi sono gli enzimi batterici multicomponente (differenti catene polipeptidiche con diversi ruoli catalitici) coinvolti nel metabolismo aerobico degli idrocarburi in generale (non solo IPA). La loro funzione consiste nell'aggiungere atomi di ossigeno, dà ossigeno molecolare, alla molecola, per aumentarne solubilità e reattività e quindi renderla suscettibile a successive reazioni. Il donatore di elettroni è generalmente un piridin nucleotide ridotto (NADH o NADPH) e l'accoppiamento con l'ossigeno molecolare è mediato da

flavo proteina. L'azione delle ossigenasi è fortemente stereoselettiva. Si distingue fra monossigenasi, che aggiungono un solo gruppo idrossile alla molecola di idrocarburo (esistono monossigenasi alifatiche e aromatiche) e riducono il restante atomo di ossigeno ad acqua; e diossigenasi che aggiungono entrambi gli atomi di ossigeno sotto forma di gruppo idrossile. In generale, il catabolismo degli IPA consiste nell'apertura di un anello dopo l'altro ad opera degli enzimi dei seguenti enzimi:

- diossigenasi di attivazione: introducono una molecola di ossigeno nell'anello aromatico utilizzando come donatore di elettroni NADH o NADPH. Il prodotto finale è un diidrodiole (composto attivato). Le diossigenasi batteriche danno cis-diidrodiole, composti che poi vengono catabolizzati;
- deidrogenasi: sottraggono due atomi di idrogeno al cis-diidrodiole utilizzando come accettore di protoni un NAD<sup>+</sup>. Questo comporta il ripristino del legame aromatico all'interno dell'anello (riaromatizzazione) e la formazione di un catecolo. Tale substrato può essere utilizzato dal successivo enzima;
- diossigenasi di apertura: introducono un'altra molecola di ossigeno nel catecolo, provocando l'apertura dell'anello aromatico. Non necessitano di piridin nucleotidi ridotti come donatori di elettroni. L'apertura può avvenire in posizione orto (intradiolo), con formazione di due gruppi carbossilici, o posizione meta (extradiolo), con formazione di un gruppo carbossilico e uno carbonilico, oltre al preesistente gruppo ossidrilico. Le vie metaboliche per la decomposizione di questi due derivati alternativi si chiamano otho-pathway e meta-pathway e portano alla produzione di acidi tricarbossilici utilizzabili nel ciclo degli acidi tricarbossilici. (9).

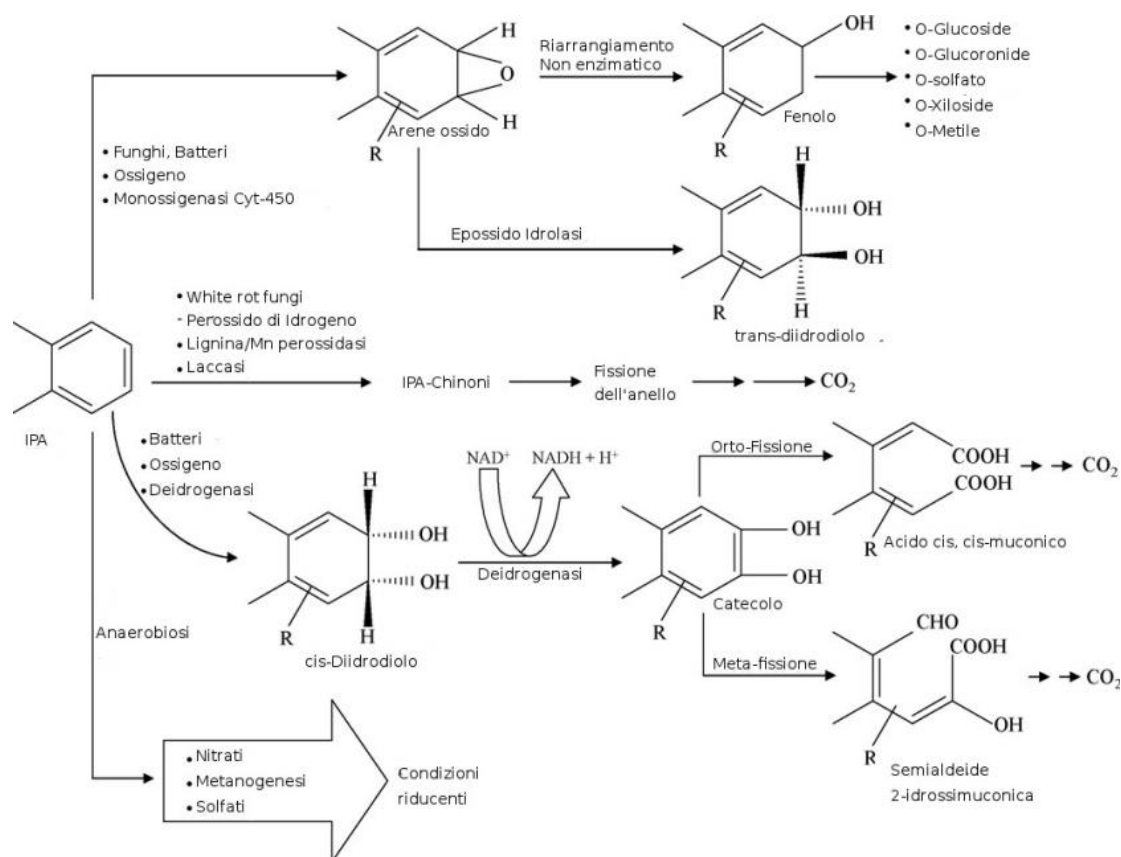


Fig.1.1.4. 1: Ossidazione IPA secondo le differenti vie

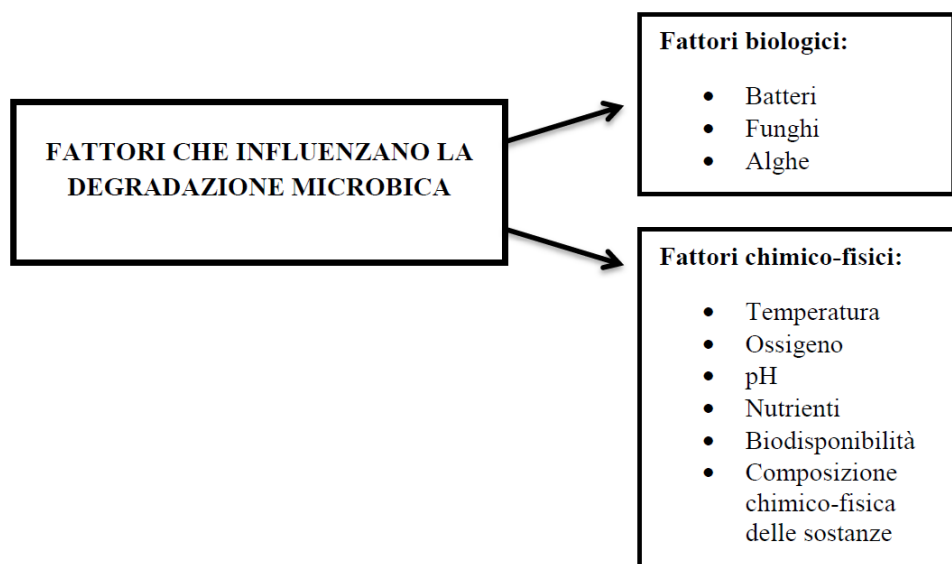
Metabolismo anaerobico è più lento e meno conosciuto. In condizioni anaerobiche (fermentazione, solfatoriduzione, denitrificazione) possono essere degradati IPA fino a tre anelli ma non è ancora stato chiarito se questo sia possibile anche per quelli più pesanti (33). Si suppone che anche in condizioni anaerobiche la degradazione degli IPA avvenga attraverso ossidazione e rottura dell'anello ad opera di enzimi omologhi delle ossigenasi, che usano come accettore di elettroni nitrati e solfati. L'efficace degradazione degli IPA avviene, del resto come in aerobiosi, a livello di comunità. L'attuale modello identifica tre stadi:

- Ossidazione iniziale degli IPA a carico dei batteri denitrificanti o solfatoriduttori;
- I metaboliti prodotti complessano gli ossidi di Fe (III) ripartiti nella fase solida e li rendono biodisponibili per i batteri ferroriduttori;

- I batteri ferroriduttori assimilano gli ossidi di Fe(III) e per cometabolismo degradano ulteriormente i metaboliti.

### **Fattori che limitano la degradazione microbica**

Sono diversi i fattori influenzano il tasso di biodegradazione degli IPA. Tra questi, le proprietà fisico-chimica degli stessi composti. Ad esempio, gli idrocarburi più leggeri, a causa del loro peso molecolare relativamente basso e della complessità strutturale, hanno tassi di degradazione più elevati di gli idrocarburi pesanti. Inoltre gli IPA pesanti risultano non facili da degradare anche a causa della loro non biodisponibilità ai microrganismi(33). L'aggiunta di solventi e surfattanti può aumentare la solubilizzazione degli idrocarburi renderli più biodisponibili alla comunità microbica. Oltre che biodisponibile, una sostanza deve essere anche bioaccessibile cioè essere raggiunta e accessibile. Questo può diminuire a causa di deposito della sostanza in un microporo, dove non è più spazialmente raggiungibile dai microrganismi, o di formazione di complessi insolubili della sostanza con altre specie chimiche presenti nel mezzo.



Schema 1. Fattori limitativi del processo di biodegradazione

Altro fattore limitante, collegato al peso molecolare, è la solubilità in acqua; meno sono solubili più il tasso di degradazione si riduce in quanto diventano meno biodegradabili.



Anche i fattori ambientali hanno la loro influenza sul tasso di degradazione degli IPA (34).

Infatti il pH condiziona gli equilibri di reazione e trasporto all'interno della cellula influenzando l'attività degradativa dei batteri sugli IPA.

La temperatura è un altro importante fattore ambientale che può influenzare l'attività microbica e quindi i tassi di degradazione. Infatti l'attività biologica aumenta con la temperatura fino a raggiungere un optimum, oltre il quale si ha un calo delle funzioni vitali, a causa della denaturazione delle proteine e alla distruzione della membrana cellulare, compromettendo l'attività di degradazione degli IPA da parte dei batteri.

La degradazione microbica degli idrocarburi dipende in gran parte dalla disponibilità degli accettori terminali di elettroni(28) e dal tipologia che determina quale via metabolica microbica si attiverà.

Infine anche i nutrienti possono risultare un fattore limitante. Gli elementi che più frequentemente si trovano nell'ambiente in difetto e che potrebbero costituire un fattore limitante, sono azoto e fosforo. Anche se un nutriente è scarso, la biodegradazione può continuare, ma ad un tasso rallentato. Questo perché le nuove cellule potranno crescere solo assimilando i nutrienti provenienti dalla degradazione delle cellule morte. Però l'aggiunta di sostanze nutritive quali nitrati, fosfati e fertilizzanti che fungono da biostimolanti (per la crescita microbica) possono avere impatti ambientali, ad es. l'eutrofizzazione (35).

### **1.1.5. Tossicità e Cancerogenicità**

Generalmente, gli IPA entrano nell'ambiente attraverso diverse vie e si trovano di solito come una miscela contenente due o più di questi composti. Molti IPA inoltre presentano proprietà tossiche, mutagene e / o cancerogene, sono potenti immunosoppressori. Inoltre gli IPA si presentano più frequentemente in miscele dove si possono avere fenomeni di sinergismo, per cui l'effetto della miscela è superiore alla somma degli effetti dei singoli composti.

Sono noti gli effetti negativi che hanno su alcuni organismi acquatici influenzati dal metabolismo e dalla foto-ossidazione, infatti è stata riscontrata tossicità acuta da moderata a alta per gli uccelli e alta tossicità cronica per la vita acquatica. Quando sono presenti in alte concentrazioni nel suolo possono provocare danni all'agricoltura (36) ed avere effetti tossici sugli invertebrati terrestri (inducendo tumori, danni alla riproduzione e allo sviluppo). Infatti le piante possono assorbire gli IPA dal terreno attraverso le loro radici e trasferirli in altre parti vegetali. I tassi di assorbimento sono generalmente governati dalla concentrazione, dalla solubilità in acqua e dal loro stato fisico-chimico, nonché dal tipo di terreno. Gli effetti fitotossici indotti dagli IPA sono ancora poco noti (36)

I mammiferi possono assorbire IPA per varie vie, per esempio: inalazione, contatto cutaneo e ingestione (37).

Gli IPA possono manifestare il loro effetto tossico principalmente attraverso due tipi di interazione con le strutture cellulari:

- Formazione di legami reversibili con siti lipofili che possono impedire i normali processi della cellula (tossicità acuta).
- Trasformazione dall'organismo in metaboliti idrosolubili, reattivi ed elettrofili, che si legano alle strutture cellulari, provocando danni a lungo termine (tossicità cronica).

Gli IPA, inoltre, sono composti genotossici, cioè provocano danni al DNA, aumentando la probabilità di formazione di tumore. Le proprietà genotossiche degli IPA sono correlate al peso molecolare, si può affermare che:

- Gli IPA a basso peso molecolare, al di sotto dei quattro anelli aromatici sono caratterizzati da pronunciata tossicità acuta;
- Gli IPA pesanti, da quattro anelli aromatici in su sono invece scarsamente tossici, ma manifestano effetti cancerogeni per esposizioni prolungate (38).

Per la loro genotossicità provata o ipotizzata, la United States Environmental Protection Agency (EPA) e la World Health Organization (WHO) hanno identificato, all'interno di questa classe, 16 composti definiti “inquinanti prioritari” (Figura 1): naftalene, acenaftilene, acenaftene, fluorene, fenantrene, antracene, fluorantene, pirene, crisene, benzo(a)antracene, benzo(b)fluorantene, benzo(k)fluorantene, benzo(a)pirene, dibenzo(a,h)antracene, benzo(g,h,i)perilene, indeno(1,2,3-cd)pirene.

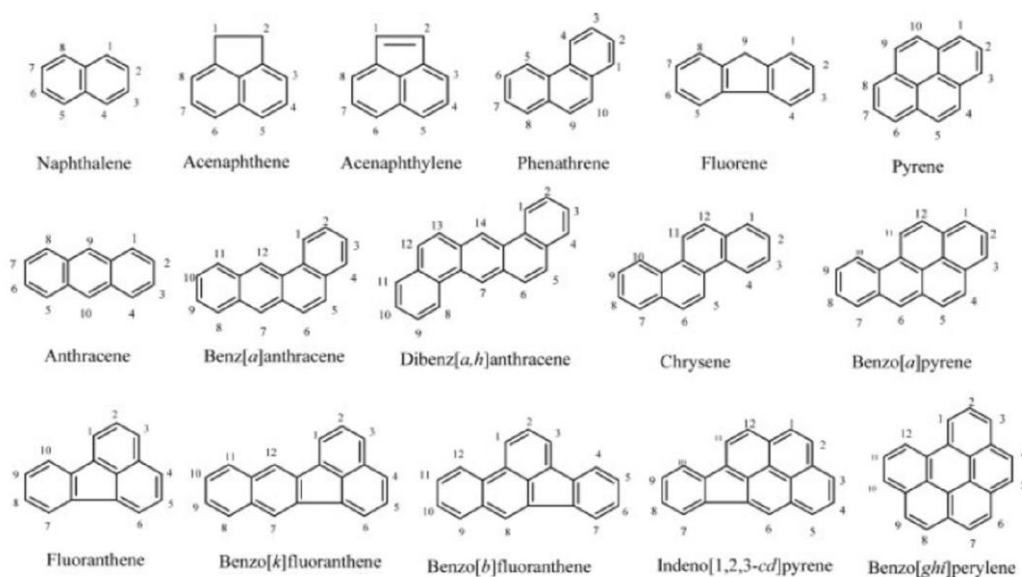


Fig 1.1.5. 1: Struttura chimica 16 IPA definiti “inquinanti prioritari” dalla United States Environmental Protection Agency (EPA) e dalla World Health Organization (WHO).

Per quanto riguarda la loro cancerogenicità, la maggior parte degli IPA sono cancerogeni completi, cioè in grado non solo di causare le mutazioni, ma anche di indurre le condizioni che rendono le cellule mutate cancerose e incentivarne la proliferazione in una massa tumorale (promozione).

Però gli IPA sono dei cancerogeni secondari, cioè non sono biologicamente attivi, chimicamente inerte e quindi richiedono una bioattivazione (39) causando così errori nella trascrizione e replicazione del DNA. Tale processo avviene, nei mammiferi, in diversi organi tra cui i principali sono il fegato, polmoni, intestino, cute e reni. I processi metabolici coinvolti sono gli stessi adottati per eliminazione degli IPA quindi dipende dalla capacità dell'organismo stesso di

trasformarli in metaboliti idrosolubili, eliminabili attraverso l'escrezione. Essi vanno incontro a trasformazioni attraverso varie reazioni metaboliche, che avvengono nell'organismo, prima che si producano le vere specie cancerogene. Uno di questi meccanismi è la loro attivazione da parte degli enzimi coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici come la citocromo-P450, UDP-glucuronosiltrasferasi, la NADPH-chinone-ossidoriduttasi. Questi enzimi partecipano alla conversione degli IPA in metaboliti a più elevata polarità in modo da facilitarne l'escrezione attraverso le urine e le feci, tuttavia, durante questi processi, si possono formare una serie di intermedi instabili e molto reattivi che possono legare il DNA e quindi conferire a questi metaboliti proprietà mutageniche e/o cancerogeniche, (40). Nell'attivazione metabolica degli IPA, le monoossigenasi CYP1A1 e i CYP1A2 che convertono gli IPA, lipofili e chimicamente inerti, in composti reattivi ed elettrofili.

Sono enzimi substrato-inducibili, la loro produzione aumenta in presenza di IPA ed altri composti xenobiotici.

Il più noto e comune idrocarburo policiclico aromatico con accertato effetto cancerogeno è il benzo(a)pirene. Numerose evidenze sperimentali indicano nel benzo(a)pirene 7,8-diol-9,10-epossido la specie maggiormente responsabile degli effetti mutageni e cancerogeni indotti dal BaP.

L'azione mutagena del benzo(a)pirene (BaP) inizia con la sua metabolizzazione in vari tessuti e organi (polmoni, pelle, esofago, colon, fegato, placenta, ecc.) finalizzato ad aumentarne l'idrofilicità e facilitarne l'escrezione attraverso urine e feci. Il recettore citoplasmatico AHR si lega agli idrocarburi in ingresso, più efficientemente a quelli planari come il BaP, in seguito dimerizza con il traslocatore nucleare aril idrocarburo (ARNT) ed il nuovo composto entra nel nucleo per interagire con i geni contenenti l'elemento di risposta xenobiotica (XRE) e indurre, in questo caso, la produzione di CYPs. La reazione è catalizzata dal sistema enzimatico citocromo P450 associato al reticolo endoplasmatico delle cellule e porta alla formazione di epossidi e specie idrossilate in varie posizioni, che possono subire a loro volta ulteriori trasformazioni

metaboliche. La prima trasformazione del BaP è dunque l'eossidazione nelle posizioni 7 e 8 (le più reattive, che rappresentano la cosiddetta regione K). L'eossido subisce quindi un attacco nucleofilo da parte dell'acqua, con formazione di un diolo, più idrosolubile. Il benzo(a)pirene-7,8-diolo che non viene escreto dall'organismo può essere ulteriormente eossidato. Il diolo eossido viene legato al DNA attraverso un attacco nucleofilo, ad esempio da parte dell'adenina provocando un danno per il DNA che causa delle mutazioni e di conseguenza un aumentato rischio di cancerogenesi.

Le mutazioni posso essere puntiformi (41). Oltre alle sostituzioni delle coppie di base, l'inglobamento di un ingombrante residuo idocarburico può indurre, nel DNA, mutazioni frameshift, delezioni, arresto di fase S, rottura di fili e varie alterazioni cromosomiche (42). Anche la foto-induzione, che si verifica in seguito ad esposizione a raggi UV, può portare alla formazione di specie ossidanti, pericolose per i tessuti biologici. Le molecole di IPA foto-attivate potrebbero interagire con i substrati organici generando radicali liberi altamente reattivi e tossici per l'organismo. Sono stati riscontrati anche effetti antiestrogenici, con meccanismi che comprendono competizione per il recettore estrogenico (ER). Per questo motivo, gli IPA vengono inclusi nell'elenco dei distruttori endocrini.

In particolare molti IPA sono classificati come “probably carcinogenic to humans” o come “possibly carcinogenic to humans” secondo l'International Agency for Research on Cancer. Sono “probabili” cancerogeni per l'uomo il BaA e il BaP.

Altri componenti gli IPA sono considerati, “possibili” cancerogeni per l'uomo perché sono incerti i risultati della tossicologia sperimentale condotta su animali da laboratorio. E' il caso dell'Indeno(1,2,3-cd)pirene.

### *Effetto sulla salute umana*

Gli IPA sono quindi dei composti che rappresentano un rischio per la salute dell'uomo. Il monitoraggio biologico dell'esposizione a IPA è di interesse primario, a causa della loro

diffusione di questi composti e della loro rilevanza tossicologica. Alcuni IPA sono noti come cancerogeni, mutageni e teratogeni.

L'esposizione agli IPA si verifica regolarmente, per la maggior parte delle persone, attraverso l'aria, cibo contenente IPA, il fumo di sigarette, gas di scarico e l'acqua che può anche contenere determinate quantità di IPA, dal momento che queste sostanze chimiche possono fuoriuscire dal suolo in acqua o possono entrare nell'acqua dagli effluenti industriali e dalle fuoriuscite accidentali.

L'uomo può assorbire gli IPA attraverso l'inalazione, l'ingestione e il contatto cutaneo. A causa della loro natura idrofobica gli IPA tendono ad accumularsi nei tessuti degli organismi esposti con una marcata tendenza ad localizzarsi a livello del grasso corporeo diventando dei depositi da cui gli IPA possono essere rilasciati. L'esposizione agli IPA non è mai a IPA singolo per questo è necessaria la comprensione della dinamica del singolo metabolismo degli IPA e dei possibili effetti tossici per valutare l'effetto delle miscele. Questo porterà a capire l'impatto preciso degli IPA.

Gli effetti sulla salute possono essere a breve termine (acuti) e a lungo termine(cronici), ciò dipende dal tempo e dal percorso d' esposizione e dalla concentrazione degli IPA.

Naturalmente ci sono anche altri fattori che influenzano l'impatto degli IPA sulla salute come l'età, il sesso, lo stile di vita, lo stato di salute preesistente ecc..

L' esposizione ad alti livelli di miscele di inquinanti contenenti IPA possono provocare irritazioni, nausea, vomito, diarrea, infiammazione cutanea, reazioni allergiche (43).

Invece gli effetti cronici sono dovuti ad esposizione agli IPA a lungo termine e possono comportare diminuzione della funzionalità immunitaria, danni a organi come il fegato e i polmoni, danni cellulari che causano mutazioni e che potrebbero portare all' insorgenza di tumori quali ai polmoni, alla pelle, vescica, dell intestino (44) e alterazioni nello sviluppo.

Tra gli effetti cronici vi l'alternazione del sistema immunitario che può indurre anche lo sviluppo di cancro. I meccanismi della tossicità immunitaria indotta dagli IPA non sono ancora chiarie

sono tutt' ora oggetto di studio. Qualunque sia il percorso di esposizione, gli effetti risultanti sono stati considerati principalmente a livello sistemico causando una maggiore suscettibilità delle persone esposte allo sviluppo di tumori, di malattie infettive, infiammazioni e malattie autoimmuni. (45).

Quindi la valutazione del rischio per la salute dell'uomo e dell'ambiente dovuto agli IPA è complicata in quanto:

- Le contaminazioni ambientali non riguardano mai un singolo IPA ma miscele, dove hanno luogo effetti sinergici;
- Gli IPA sono cancerogeni secondari, per cui manifestano attività cancerogena se la metabolizzazione porta alla formazione di particolari stereoisomeri.
- Dati riguardanti l'esposizione cronica ad IPA sugli esseri umani riguardano maggiormente miscele di IPA e non singoli composti;
- La matrice e la via di esposizione influenzano notevolmente sia la potenzialità cancerogena che le procedure di valutazione.

## 1.2. TECNICHE DI BONIFICA

L'interesse scientifico, negli ultimi decenni, si sta progressivamente concentrando sul recupero di siti contaminati da idrocarburi policiclici aromatici (IPA). Diverse tecnologie di bonifica sono state sviluppate e testate nel tentativo di rimuovere questi contaminanti ambientali. Tra questi, la bioremediation potrebbe rappresentare una valida opzione in termini di sicura e convenienza. Infatti sono stati isolati una varietà di generi di batteri gram-positivi e non-negativi, capaci di utilizzare gli IPA nei loro processi metabolici portando alla loro degradazione o trasformazione in composti meno tossici.

Con il termine “bonifica” s'intende l'insieme degli interventi atti ad eliminare le fonti d'inquinamento e le sostanze inquinanti, o a ridurne le concentrazioni nel suolo, nel sottosuolo e nelle acque superficiali e sotterranee ad un livello uguale o inferiore agli standard fissati dalla normativa.

Le tecniche convenzionali di bonifica risultando pericolosi e costosi. Ad esempio per il trattamento di suoli e sedimenti contaminati, è prevista l'escavazione e trasferimento in discarica oppure copertura ed isolamento dell'area inquinata che presentano una serie di svantaggi : il problema non viene risolto ma spostato , con rischi elevati durante le fasi di escavazione, movimentazione e trasporto, invece , con il metodo del contenimento si ha una soluzione temporanea in quanto gli inquinanti rimangono nel sito, con conseguente monitoraggio costante e manutenzione a costi elevati.

Per risolvere queste problematiche e ottenere il risanamento del sito contaminato, sono stati sviluppati nel tempo diversi trattamenti tesi alla completa, per quanto possibile, distruzione degli inquinanti o dalla loro trasformazione in sostanze innocue. Questi processi di bonifica sono stati suddivisi, in base al luogo nel quale il trattamento depurativo viene svolto, in due grandi categorie:



- trattamenti *ex situ*: prevedere il trasporto del sito contaminato, per il trattamento, in un impianto mobile o semimobile in loco (on site), o un impianti localizzato altrove (off site) . Di solito questi trattamenti hanno un notevole impatto ambientale.
- trattamenti *in situ*: prevede il trattamento direttamente nella sede naturale con notevoli vantaggi in quanto sia ha un maggior controllo diretto sul processo di risanamento, una maggiore varietà di processi disponibili, tempi più ridotti di applicazione e maggiore uniformità nel processo di bonifica. Inoltre i costi sono ridotti e si ha un minor impatto ambientale.

Le tecniche d bonifica possono essere ulteriormente classificate, in base al tipo di metodo applicato, in:

- Metodi chimico-fisici;
- Metodi termici;
- Metodi biologici (Bioremediation)

Nella seguente tabella, sono riassunte le caratteristiche delle diverse tipologie di trattamenti di bonifica con relativi vantaggi e svantaggi nell' applicazione in campo

Trattamento	Caratteristiche	Svantaggi	Vantaggi
<b>Chimico-fisici</b>	Trasformazione degli inquinanti in composti meno mobili, o separazione dell'inquinante dalla matrice.	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Diffondere e aggravare l'inquinamento del sito</li> <li>■ Costi elevati</li> <li>■ Tecnologia complessa</li> <li>■ Incompleta decomposizione degli inquinanti</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Tempo brevi</li> </ul>
<b>Termici</b>	Separazione dell'inquinante per volatilizzazione, desorbimento, degradazione o distruzione termica.	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Diffondere e aggravare l'inquinamento del sito</li> <li>■ Costi elevati</li> <li>■ Tecnologia complessi</li> <li>■ Incompleta decomposizione degli inquinanti</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Tempi brevi</li> </ul>
<b>Biologici</b>	Degradazione e trasformazione degli inquinati in composti meno tossici	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Tempi lunghi</li> <li>■ Disponibilità composti biodegradabili</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Basso costo</li> <li>■ Tecnologia meno complessa</li> <li>■ Basso impatto ambientale</li> <li>■ Rimozione inquinanti</li> </ul>

### **1.2.1. Metodi chimico-fisici**

Si tratta di processi che portano alla trasformazione degli inquinanti in composti meno tossici o meno mobili, tramite sistemi chimici, o alla separazione dell'inquinante dalla matrice sia essa solida che liquida, mediante sistemi fisici.

Questi trattamenti possono essere classificati in:

1. trattamenti chimico-fisici di estrazione: operano la separazione e rimozione dei contaminanti della matrice
2. trattamenti chimico- fisici di detossificazione : alterano la struttura chimica del contaminante mediante processi chimici per trasformarlo in un composto meno tossico.
3. trattamenti chimico- fisici di immobilizzazione: riducono la mobilità dei contaminanti, confinandoli in una matrice solida o stabilizzandoli chimicamente.

Questi trattamenti sono in generale i più efficaci in termini di rapporto costi-benefici.

Uno dei metodi fisico-chimici più usati per la rimozione di idrocarburi provenienti da siti contaminati è l'uso di skimmers, dispositivi progettati per separare e recuperare liquidi oleosi emulsionati in una massa d'acqua o galleggianti su di essa. Questo è un metodo molto attivo, veloce ma dispendioso a livello economico ed è principalmente impiegato come una risposta di emergenza alle fuoriuscite di petrolio soprattutto in ambiente marino. Inoltre, questo metodo, rimuove solamente dal sito contaminato gli inquinanti che andrebbero poi sottoposti ad ulteriori trattamenti per la loro degradazione utilizzando altre tecnologie di bonifica. Oltre a questo, può essere solo applicato su acqua superficiale.

Un altro metodo per la bonifica da idrocarburi è l'adsorbimento che utilizza una gamma di adsorbenti come, carbone attivo, copolimeri, zeoliti ecc. Ad esempio, il carbone attivo può rimuovere idrocarburi petroliferi dissolti in modo efficace (46). Il problema riguarda però lo

smaltimento degli adsorbenti esauriti. Inoltre, questi materiali sono generalmente costosi e i loro processi di rigenerazione sono problematici (47).

Spesso vengono impiegati reagenti chimici, come disperdenti, per emulsionare gli idrocarburi presenti in suolo, sedimenti o acqua contaminata. Però questo metodo presenta un limite per la dispersione di idrocarburi pesanti inoltre spesso può risultare tossico per l'ambiente (12). Infatti, con questo metodo, gli inquinanti vengono semplicemente dispersi (ad esempio, in acqua) per permetterne la degradazione da parte di processi naturali come fotodegradazione e/ degradazione microbica. Questi processi possono però produrre dei composti più tossici di quelli da cui hanno origine (48) con conseguenze negative sull' ambiente. Inoltre presenta elevati costi di bonifica.

Altri metodi fisico-chimici includono, processi di volatilizzazioni, precipitazioni chimiche con l'uso di agenti coagulanti e / o flocculanti. Questo metodo, ad esempio, utilizza composti come calcite, calce, sodio caustico, ceneri di sodio per rimuovere particelle sospese in siti contaminati da idrocarburi ma i fanghi, che si generano, sono difficili da smaltire.

La maggior parte di questi metodi, anche se richiedono tempi di trattamento minori rispetto ai trattamenti biologici, sono più sensibili alle variazioni delle caratteristiche del sito da bonificare e sono spesso costosi, tecnologicamente complessi (42)

### **1.2.2. Metodi Termici**

Consentono l'abbassamento della concentrazione degli inquinanti attraverso processi ad temperature elevate, la rimozione o l'immobilizzazione di sostanze inorganiche, nel caso in cui siano vaporizzabili e quindi ossidabili, a basse temperature. Quindi questi trattamenti sono realizzati mediante processi che inducono la separazione dell'inquinante per volatilizzazione, desorbimento, degradazione o distruzione termica.

Tali metodi possono essere effettuati direttamente in situ, oppure in impianti mobili o trasportabili (*on site*). A seconda del processo adottato esistono diverse tipologie di trattamento:

- Desorbimento termico: tecnologia non distruttiva utilizzata nel trattamento di suoli contaminati da idrocarburi. In questo metodo, i contaminanti organici vengono convertiti da solido a gas mediante un'aumento di pressioni attraverso il calore applicato, (49). I gas prodotti vengono condensati con trattamento e recupero delle fase liquida o diversamente trattati.
- Termodistruzione o incenerimento: determinano la volatilizzazione, l'ossidazione termica o la distruzione termica dei contaminati mediante dall'applicazione di calore ad alta temperatura(600°C-2000°C).

Tali trattamenti possono essere effettuati direttamente *in situ*, attraverso l'energizzazione del suolo con appositi elettrodi, in impianti fissi (*off site*) oppure in impianti mobili o trasportabili (*on site*).

Tuttavia, i metodi termici presentano, tra gli svantaggi, i costi elevati (50).

### **1.2.3. Metodi biologici**

La necessità di risanare siti contaminati ha portato allo sviluppo di nuove tecnologie volte alla distruzione dei composti inquinanti .Una di queste tecnologie è il biorisanamento che utilizza il potenziale metabolico dei microrganismi al fine di decontaminare ambienti inquinati .Quindi il biorisanamento sfrutta la capacità dei microrganismi, in singolo o in consorzio, di biotrasformazione e degradare i contaminanti in composti meno o non pericolosi per l' ambiente e la salute ,accelerando i processi degradativi che normalmente avverrebbero in natura.

Nei siti contaminati, spesso, sono già presenti microrganismi in grado di degradare i contaminanti, ma non si trovano in condizioni ottimali o, si trovano in presenza di fattori inibenti (bassa temperatura, pH acido, carenza di ossigeno, presenza di sostanze tossiche, assenza di nutrienti, contenuto insufficiente di acqua). Di conseguenza i tempi necessari per i processi di degradazione spontanea sono incompatibili con le esigenze di bonifica in quanto eccessivamente lunghi e non per forza efficaci.

Quindi, per far sì che la degradazione del contaminante e/o contaminanti avvenga in modo più possibile completo e veloce, è necessario ottimizzare le condizioni nelle quali operano i batteri, aggiungendo nutrienti ed ossigeno, controllando il pH, l'umidità e la temperatura.

Per aumentare la velocità e l'efficienza dei processi di degradazione microbica, le due tecnologie principalmente usate sono la *bioaugmentation* e la *biostimulation*.

La *biostimulation* consiste nell'aggiunta al mezzo di sostanze necessarie all'attività microbica che potrebbero trovarsi in carenza: nutrienti, fonti alternative di carbonio, fattori di crescita, ossigeno o altri accettori di elettroni (51).

La *bioaugmentation* consiste nell'introdurre, nell'ambiente preso in considerazione, un inoculo di popolazioni microbiche esogene, con attività cataboliche specifiche per la degradazione degli inquinanti, per supportare le popolazioni autoctone incapaci a degradare i contaminanti, in quanto non posseggono le vie metaboliche necessarie o i contaminanti risultano tossici per la popolazione autoctona o le popolazioni autoctone degradano gli inquinanti in composti più tossici di quelli iniziali per la comunità. Questo è molto frequente per siti precedentemente non contaminati, in cui la selezione naturale non ha comportato la diffusione di queste vie degradative. L'inoculo di popolazioni microbiche, prelevate ad esempio da siti già contaminati, dove le attività degradative sono già in atto, presentano nel pool genetico la capacità di degradare i contaminanti e attraverso i fenomeni di coniugazione queste vie metaboliche, possono estendersi alle specie locali. Tuttavia l'inoculo può dimostrarsi inefficace, perché si verificano fenomeni di predazione e/o condizioni ambientali sfavorevoli. Esistono strategie basate sull'inoculo di specie donatrici, incapaci di sopravvivere nel nuovo ambiente, ma che forniscono i plasmidi per il metabolismo degli inquinanti attraverso lo scambio orizzontale e consentono la creazione di transconiugati, ecologicamente competitivi ed in grado di degradare gli inquinanti (51).

I limiti che presenta la bioremediation sono legati al fatto che alcuni inquinanti, come gli idrocarburi aromatici più pesanti, risultano essere resistenti agli attacchi microbici quindi o non

vengono degradati oppure lo sono ma a ritmi molto lenti. Inoltre la maggior parte dei siti risulta contaminata da miscele di inquinanti. Per questi motivi risulta difficile prevedere i tempi necessari per il completamento di un intervento di biorisanamento.

Per ottenere, quindi, una efficace strategia di biorisanamento è necessario comprendere bene l'interazione tra l'ecologia microbica, le condizioni ambientali, le caratteristiche strutturali e fisico-chimiche dei contaminanti (20). A causa di questa complessità, l'efficacia del biorisanamento necessita di un approccio multidisciplinare che coinvolge microbiologia, ingegneria, ecologia, geologia e chimica.

Comunque il biorisanamento sta acquisendo un crescente interesse in quanto l'impiego di microrganismi si è rivelato vantaggioso sia da un punto di vista tecnico, ecologico ed economico (5). Inoltre è una soluzione permanente, a basso impatto ambientale e può essere impiegata per il trattamento di specifici inquinanti quali metalli o idrocarburi di petrolio (52). Queste vantaggi rendono i metodi biologici preferibili ai metodi fisico-chimici e termici. (53).

#### *Tecnologie di bioremediazione ex situ e in situ*

Le tecnologie di bioremediation in situ coinvolgono il trattamento del materiale contaminato nella sua posizione originaria. È applicato a siti che presentano una contaminazione diffusa, in profondità e con una concentrazione dei contaminanti medio/bassa(54). Questi trattamenti hanno l'obiettivo di aumentare l'attività microbica indigena, in modo che i contaminanti vengano rimossi ad una velocità e un'efficienza superiori rispetto a quelle ottenibili senza interventi.

Per raggiungere tale obiettivo vengono iniettati sostanze nutritive e accettori di elettroni e/o modificati alcuni parametri ambientali nei ai siti contaminati.

Le principali tecniche di biorisanamento in situ sono:

**Bioventilazione (Bioventing):** La bonifica è effettuata dai microrganismi aerobici autoctoni, cioè già presenti nel terreno, e consiste nel fornire O<sub>2</sub> ai microrganismi presenti nel suolo

attraverso l'immissione d'aria provocando una proliferazione dei microrganismi autoctoni, che con la loro attività degradano i composti organici adsorbiti dalle componenti minerali e organiche del sito contaminato. Con questo processo è possibile rimuovere le sostanze aerobicamente degradabili e tale tecnologia può essere applicata con successo nella degradazione di molti prodotti petroliferi soprattutto quelli a basso o medio peso. I vantaggi: sono richiesti tempi relativamente corti per la bonifica di siti contaminati (6-24 mesi) ed è una tecnologia facilmente combinabile con altre; e gli svantaggi: non può essere applicata in siti caratterizzati da bassa permeabilità, alto contenuto di argilla, risulta realmente efficace solo nel trattamento della zona insatura del terreno (55).

**Biosparging e Bioventing:** E' un processo combinato che tratta contemporaneamente la zona satura e quella insatura del suolo. Viene immessa aria compressa (Biosparging) nella zona satura contaminata mediante pozzi, determinando un aumento dell'ossigeno con conseguente stimolazione dell'attività biodegradativa. Gli inquinanti altamente volatili passano alla fase vapore e migrano verso l'alto raggiungendo la zona vadosa sovrastante, dove possono essere biodegradati direttamente nel terreno insaturo oppure raccolti e captati e trattati prima di essere scaricati in atmosfera. Gli inquinanti poco volatili vengono invece biodegradati nella zona satura grazie all'O<sub>2</sub> fornito con l'aria. Tale tecnica si presta bene per la bonifica di siti abbastanza permeabili, di un buono spessore e contaminati da sostanze volatili(56).

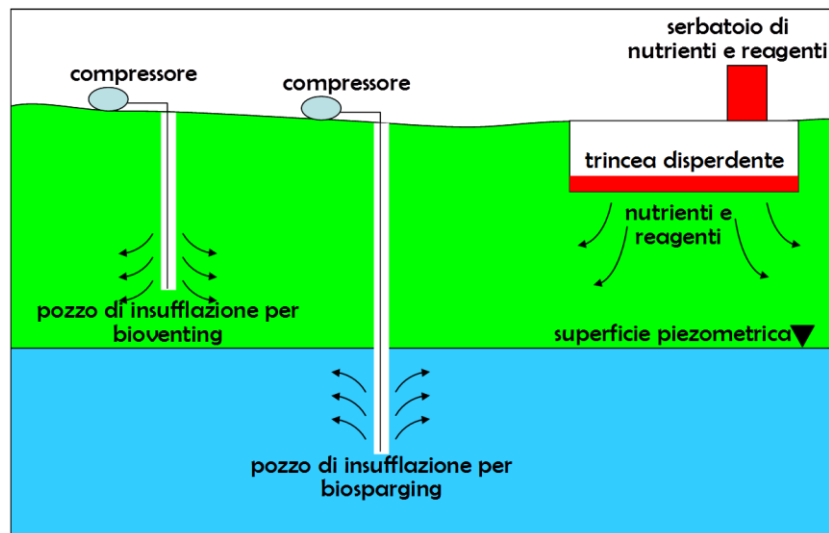


Fig.1.2.3. 1: Bioventing e Biosparging

**Barriere reattive permeabili (PRBs):** si basa sullo scavo di una trincea a valle idrogeologico del terreno da bonificare, che viene riempita con un materiale reattivo (capace cioè di degradare gli inquinanti a sostanze non tossiche, o meno tossiche); i moti di falda portano l'acqua inquinata a transitare attraverso la barriera, nella quale avvengono reazioni di ossidoriduzione che riducono la concentrazione di alcuni inquinanti (57). I vantaggi sono: costi di manutenzione ridotti, trattamento in situ, reintegrazione del suolo e delle acque sotterranee. Tuttavia, i PRB sono applicabili solo in siti con una contaminazione non in profondità e sono relativamente costosi.

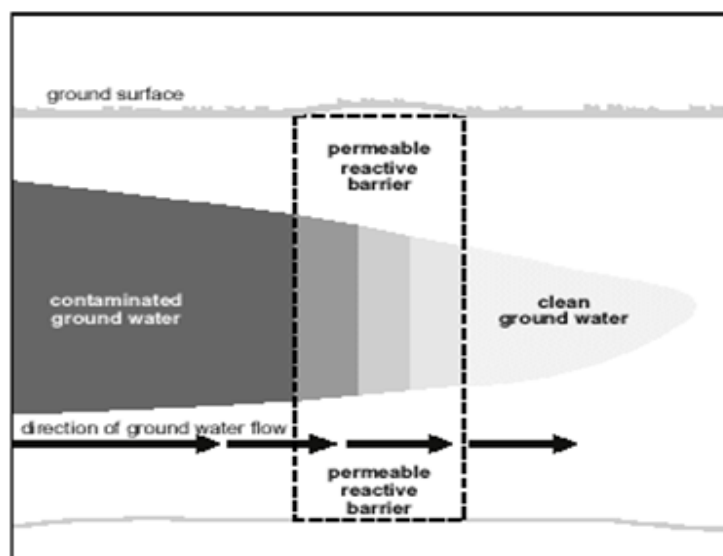


Fig.1.2.3. 2: Barriere reattive permeabili



**Elettrobiorisanamento:** è una tecnica che utilizza sia l'elettroosmosi sia la elettromigrazione per avviare o migliorare la biodegradazione in situ dei contaminanti sotto una bassa tensione applicata (3-20V) attraverso gli elettrodi posti all'interno del terreno contaminato. Questa tecnologia è particolarmente efficace in terreno contaminato con bassa conducibilità idraulica e grande superficie (58). Fattori di crescita biologici quali tensioattivi, sostanze nutritive possono essere iniettate all'interno del terreno. Nonostante i vantaggi dei metodi biologici, esistono ancora molteplici limitazioni come l'ingresso di energia, terreni a basso livello di conduttività idraulica, substrato non biodisponibile, costi di manutenzione, eterogeneità della matrice del suolo, la tossicità dei contaminanti.

Il **fitorimediazione**, sfrutta i processi di assimilazione, accumulo e degradazione degli inquinanti di suolo, acque e sedimenti propri delle piante vascolari. Tutte le piante estraggono assieme ai nutrienti gli inquinanti dall'ambiente alcune accumulano quantità di contaminanti senza che questi siano usati nelle loro funzioni vitali. Il fitorimediazione è stato particolarmente studiato per quanto riguarda la rimozione di metalli dai suoli e gli IPA. Gli inquinanti possono essere rimossi mediante questi processi (50):

- **rizofiltrazione:** gli inquinanti sono trattenuti dalle radici;
- **fitoestrazione:** gli inquinanti sono accumulati nei loro tessuti;
- **fitotrasformazione:** le piante assimilano gli inquinanti e li degradano nei loro processi metabolici;
- **fitostimolazione:** in cui la degradazione microbica locale, stimolata le attività biologiche delle piante nella zona radicale.

Tale tecnica è applicabile ad una grande varietà di inquinanti e ha basso impatto ambientale, in quanto la produzione di rifiuti è minima. La strategia è stata applicata per sedimenti, ma anche per il risanamento di acque poco profonde. Gli svantaggi sono la degradazione dei contaminanti in intermedi ossidati più pericolosi dei composti di partenza.

Le tecnologie di bioremediazione *ex situ* sono quelle che coinvolgono la rimozione fisica / scavo del materiale contaminato dall'originale l'ubicazione in un impianto di trattamento o in un altro sito per ulteriori trattamenti. Questi trattamenti sono facilmente controllati e monitorati e richiedono un periodo di trattamento minore; delle tecnologie in situ. Tuttavia, scavi, costi di trasporto, rischio di esposizione ambientale durante il trasporto tra gli altri rendono meno conveniente.

Tra le tecnologie che si applicano in *ex-situ*

**Landfarming:** è un processo che consiste nel porre uno strato di 20-60 cm di terreno in fase solida sopra ad uno strato di 20-30 cm di sabbia, a sua volta delimitato inferiormente da uno strato impermeabile, costituito di argilla o materiale plastico, al fine di evitare percolamento. Il terreno viene periodicamente dissodato, per miscelarlo ed arearlo, e l'umidità è regolata mediante aggiunta di acqua, la quale è raccolta in tubi perforati di seguito ricircolata e trattata separatamente. Spesso vengono aggiunte sostanze nutritive al fine di promuovere le specie microbiche autoctone presenti nei siti contaminati. (50).

**Il compostaggio:** Il suolo viene disposto in cumuli o in strati sovrapposti, fornendo ossigeno mediante movimentazione con mezzi meccanici o insufflando aria tramite tubi fessurati posti all'interno del cumulo. La tecnologia di compostaggio comporta la mescolanza del terreno contaminato con un materiale organico maturo, curato (chiamato compost) per degradare i contaminanti. Il compostaggio è stato applicato con successo nel trattamento di terreni contaminati da composti aromatici volatili, fenoli, idrocarburi policiclici aromatici fino a quattro anelli benzenici (59). Spesso possono essere forniti nutrienti, fonti di carbonio e microrganismi con elevata capacità metabolica

Lo svantaggio è la dispersione in termini energetici.

**Bioreattori:** Maggiore biodegradazione in un contenitore o in un reattore si ottiene aumentando il tempo di contatto tra il suolo contaminato e i microrganismi in condizioni ottimali di

nutrienti, ossigeno e pH. I bioreattori trovano applicazione nel trattamento di suoli e sedimenti contaminati con composti difficilmente degradabili. In quanto permette di aumentare la velocità e la resa del processo di biorisanamento, controllare e gestire i principali parametri di processo, avere un elevato grado di miscelazione e di omogeneità, monitorare la produzione e di contenere eventuali metaboliti della degradazione degli inquinanti. È ampiamente abituato trattare gli effluenti industriali e i suoli/sedimenti contaminati da composti molto recalcitranti come gli IPA (60). L'utilizzo dell'ossigeno aumenta l'efficienza del processo di biodegradazione.

Recentemente i Sistemi Bioelettrochimici (BES) sono tenuti molto in considerazione visto la necessità di rendere più conveniente, efficiente ed ecologico metodi per il trattamento di siti contaminati ad esempio da idrocarburi. I sistemi bioelettrochimici sono stati suggeriti come potenzialmente per la degradazione di contaminanti con concomitante produzione di energia elettrica (61).

**Sistemi Bioelettrochimici:** I sistemi bioelettrochimici sono un insieme emergente di tecnologie che utilizzano microrganismi che catalizzano reazioni elettrochimiche attraverso interazioni con gli elettrodi (anodo e/o catodo) in cellule elettrochimiche (62). Ci sono due tipi principali di BES che, sono comunemente conosciuti come: Celle a combustibile microbico (MFC) e elettrolisi microbica a cellule (MEC). Una MFC è una cella elettrochimica in cui dalle reazioni redox catalizzate dai microrganismi viene generata corrente termodinamicamente spontanea e elettrica. Viceversa, è considerata come una cella di elettrolisi microbica se viene fornita energia elettrica per attivare, azionare le reazioni elettrochimiche non spontanea. Quindi viene utilizzata una fonte esterna di energia per rendere il bioprocesso termodinamicamente fattibile. MFC, contrariamente ai MEC, possono essere impiegati per la rimozione di contaminanti recalcitranti permettendo, contemporaneamente, il recupero energetico convertendo l'energia chimica immagazzinata nei contaminanti in elettricità utilizzabile.

Un'ulteriore distinzione, nei sistemi elettrochimici, riguarda quelle tecnologie che convertono l'energia chimica della sostanza organica in energia elettrica rinnovabile attraverso vie biochimiche.

In base al biocatalizzatore che impiegano possiamo distinguere:

- Celle a combustibile enzimatiche (EFC) quelle che utilizzano specifici enzimi
- Celle a combustibile microbiche (MFC) quelle che utilizzano microrganismi interi contenenti vie enzimatiche complete.

Nelle MFC, gli organismi sono in grado di rigenerare le richieste enzimatiche come parte del loro funzionamento naturale (63), offrendo un vantaggio rispetto alle EFC, che, però, hanno un più veloce tempo di risposta grazie ai percorsi chimici semplici.

### 1.3. MICROBIAL FUEL CELL (MFC)

Le **Celle a combustibile microbiche**, sono dei sistemi innovativi che mimano un sistema biologico in cui i batteri non trasferiscono direttamente gli elettroni prodotti dal loro metabolismo agli accettori elettronici chimici, ma ad un elettrodo, consentendo la conversione dell'energia chimica in elettricità.

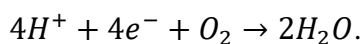
L'origine di questa tecnologia risale agli inizi dei primi del '900 quando Potter M.C dimostrò la generazione di corrente elettrica in una cella elettrochimica utilizzando una cultura di *Escherichia coli* come biocatalizzatore (64). Successivamente lo sviluppo di questi sistemi ha avuto un'evoluzione molto lenta con alcuni piccoli contributi di Cohen (1931), Suzuki et al (1978) Allen e Bennetto (1993). Poi agli inizi degli anni '90, l'interesse scientifico per le BES è aumentato in quanto è incrementata la richiesta di fonti rinnovabili di energia dovuta alle domande energetiche globali che stava causando un'intensificazione dei cambiamenti climatici. Ciò ha portato allo sviluppo tecnologico delle BES in, particolar modo, delle MFC in termini di generazione di bioenergia, produzione di sostanze chimiche a valore aggiunto e applicazione in numerosi campi della bonifica.

Attualmente i sistemi MFC sono state ampiamente utilizzate nel trattamento delle acque reflue da diverse fonti con generazione di energia rinnovabile (65). Altre applicazioni MFC includono bioremediazione dei composti xenobiotici (66). La tecnologia MFC ha mostrato, recentemente, un'importante potenzialità nel risanamento dei sedimenti inquinati con idrocarburi e metalli pesanti, con parziale recupero energetico mediante produzione di energia elettrica (67). Altre possibili applicazioni delle MFC riguardano:

- Biorisanamento di terreni e acque contaminate con inquinanti organici ed inorganici;
- Produzione di idrogeno o altri biocombustibili e la riduzione di agenti diversi dall'ossigeno, come nitrati, nitriti e solfati;
- Monitoraggio biofouling (fouling probes);
- Trattamento di scarti alimentari;
- Energia per biosensori (68) ad esempio nei fondali marini; sensori per BODs

### 1.3.1. Principio di funzionamento MFC

Le MFC possono utilizzare microorganismi come *Geobacter* spp o *Pseudomonas* spp. o consorzi microbici per catalizzare l'ossidazione anodica dei substrati producendo elettricità quando collegato ad un carico / resistore, tramite un circuito esterno, al catodo. La riduzione di protoni per formare l'acqua avviene presso il catodo. La corrente elettrica generata in MFC è una misura indicativa della conversione del substrato all'anodo (57). Una MFC può generalmente essere descritta come una cella elettrochimica con una camera anodica anaerobica e una camera catodica separata da una membrana selettiva ionica oppure no, collegata ad un circuito esterno su un carico. Nella camera anodica, i microorganismi ossidano i composti organici, contenuti in diversi substrati (acque reflue municipali e agroindustriali, sedimenti, rifiuti organici solidi (69), come combustibili/fonte di energia per loro metabolismo rilasciando elettroni, protoni e producendo cataboliti. Gli elettroni sono raccolti dall'elettrodo anodo, successivamente, fluiscono attraverso un circuito esterno, in conseguenza di una differenza potenziale stabilita tra elettrodi, al catodo. Il catodo può essere direttamente esposto all'aria o imbevuto di un aerobico soluzione: qui, gli elettroni reagiscono con l'accettore finale, di solito O<sub>2</sub> (comburente) (70). Il trasferimento degli elettroni con l'anodo è mediato dall'attività di batteri elettroattivi (71), responsabili anche del rilascio di ioni H<sup>+</sup> che, per gradiente di concentrazione, passano al comparto catodico. In prossimità della superficie del catodo, i protoni reagiscono con elettroni e ossigeno, formando acqua come prodotto finale (la reazione di riduzione dell'ossigeno):



Il passaggio dei protoni all'interno del sistema, garantisce il mantenimento dell'equilibrio della carica al suo interno e completa il circuito elettrico. Ogni carica negativa che fluisce attraverso il circuito elettrico deve essere compensata con un flusso uguale ma di carica positiva, attraverso l'elettrolita, per prevenire la sovratensione di carica, ma anche per prevenire fluttuazioni severe di pH .

In una cella elettrochimica, dove i microorganismi consumano un substrato come lo zucchero in condizioni aerobiche, le reazioni redox, che portano alla produzione di energia, sono le seguenti:

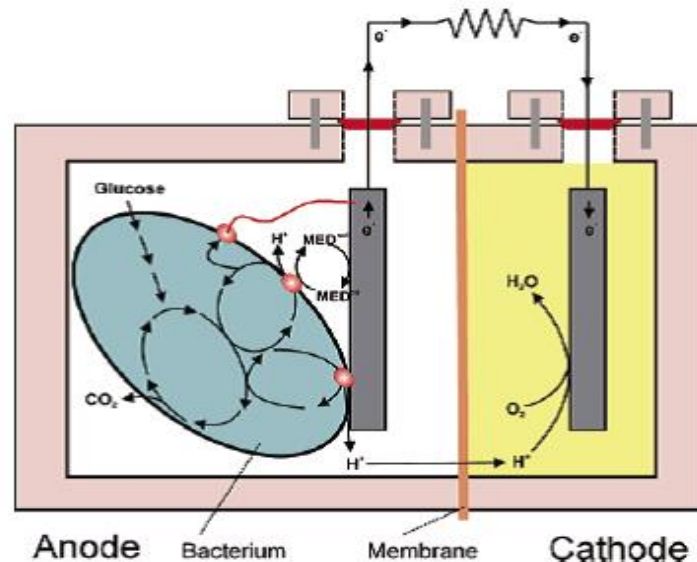
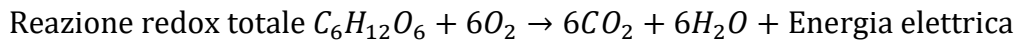
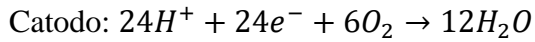
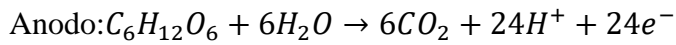


Fig.1.3.1. 1: Funzionamento MFC double-chambers

I microrganismi in una MFC quindi ottengono energia dall'ossidazione di un substrato per supportare la propria crescita. Per quest'ultimo motivo, questa tecnologia viene considerata autosostenibile (71).

I meccanismi di trasferimento degli elettroni, liberati durante l'ossidazione microbica, all'anodo avvengono per mezzo di un trasferimento diretto o indiretto. Però di questi meccanismi non si hanno molte conoscenze ed alcuni aspetti sono ancora poco compresi e oggetto di studio. Allo stato attuale è possibile proporre che per il trasferimento diretto degli elettroni avviene attraverso una catena di proteine presenti sulla membrana esterna dei microrganismi, come i citocromi di tipo C (67). Per il trasferimento indiretto potrebbe avvenire attraverso mediatori redox, che possono essere prodotti dai batteri stessi o aggiunti.

Un mediatore (mobile) è un componente la cui funzione è quella di entrare nella cellula, subire l'ossidazione, accettando elettroni dai trasportatori intracellulari, una volta ridotto uscire dalla cellula carico di elettroni che vengono portati a un elettrodo dove vengono depositati questo elettrodo diventa l'anodo elettro-generatore (l'elettrodo negativo). Il rilascio degli elettroni riporta il mediatore nello stato ossidato, pronto a ripetere il processo. Naturalmente il processo può avvenire soltanto in condizioni anaerobiche poiché, se fosse presente l'ossigeno, esso raccoglierebbe tutti gli elettroni a causa della sua maggiore elettronegatività rispetto al mediatore.

Un mediatore esterno risulta efficace se soddisfa le seguenti richieste:

- un potenziale abbastanza diverso da quello che ha il microorganismo, per facilitare il trasferimento degli elettroni;
- un alto coefficiente di diffusione nella membrana cellulare;
- non deve essere influenzato da variazione di pH;
- deve essere stabile nel mezzo utilizzato,
- non deve reagire con l'eventuale ossigeno disciolto in soluzione;
- deve trasferire velocemente gli elettroni dal microorganismo all'elettrodo;
- avere buona capacità per ripetuti cicli redox;
- non presentare tossicità.

Esempi di mediatori redox aggiunti sono la riboflavina (72), Piocianinae, gli Acidi umici. I mediatori prodotti dai batteri possono essere mediatori riducenti rilasciati in soluzione. In generale sono più efficienti nel trasporto degli elettroni e possono essere metaboliti primari, o secondari.

I metaboliti primari come i solfuri o gli ioni ferrici, spesso, presentano lo svantaggio di agire come accettori di elettroni. I metaboliti secondari, quali fenazina, vengono considerati abbastanza efficienti nel trasferimento degli elettroni (67). Comunque non tutti i batteri producono tali componenti.



Ci sono i microrganismi elettrogeni, che possono extracellularmente trasferire gli elettroni all'anodo, come le specie di *Geobacter* e *Pseudomonas* (73). Tuttavia, ci sono anche altri gruppi di microrganismi non elettrogeni (principalmente batteri fermentativi e metanogeni) che possono metabolizzare substrati organici complessi in composti più semplici che possono, a loro volta, essere assimilati direttamente dai batteri elettrogeni (74). In questo modo collaborano indirettamente alla produzione di energia.

Comunque molti aspetti in riguardo al metabolismo energetico su cui si basa il funzionamento delle MFC e la modalità con cui le diverse specie batteriche cedono elettroni all' anodo restano ancora da chiarire (71)

I microrganismi elettrogenici possono portare alla formazione di un biofilm elettroattivo sugli elettrodi. Dall'analisi della comunità di biofilm elettroattivi delle MFC, che si sviluppa sugli elettrodi, si rivela che, non esiste un unico microorganismo emergente o “vincitore”. Non tutti i microrganismi associati all'anodo nel biofilm interagiscono con esso direttamente, ma possono interagire in modo indiretto tramite altri “membri” della comunità sull'elettrodo stesso.

I parametri elettrici di una MFC sono, principalmente, la corrente generata  $I$ , la tensione a circuito aperto OCV, quella ai capi di una resistenza esterna e la potenza prodotta su un carico elettrico esterno. Il grafico che rappresenta tutte queste grandezze è riportato in figura 1.3.1. 2, che è composto dalla curva di polarizzazione (continua) e di potenza (tratteggiata):

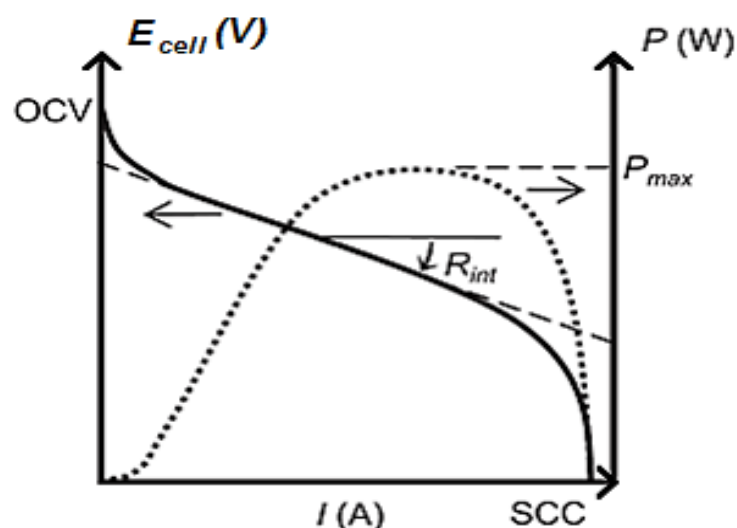


Fig.1.3.1. 2: Curve di polarizzazione (continua) e di potenza (tratteggiata) utilizzata per valutare le prestazioni elettriche di una MFC

Una curva di polarizzazione rappresenta l'andamento della tensione ai capi di una MFC in funzione della corrente circolante nel circuito, pertanto l'effettuazione di curve di polarizzazione nell'intervallo di corrente-tensione in cui le celle sono attive permette di valutare le prestazioni di una MFC. Una curva di polarizzazione, si elabora inserendo, una alla volta e per un tempo sufficiente a stabilizzare la tensione, una serie di resistenze elettriche diverse, di valore noto, nel ramo esterno di collegamento fra i due elettrodi della cella. Un obiettivo comune a tutti i generatori di energia elettrica è quello di massimizzare la quantità di potenza disponibile; nel caso MFC questo corrisponde al più alto valore di corrente circolante nel circuito con il più alto valore di tensione misurata ai capi della resistenza esterna fissa. Inoltre dalla curva di polarizzazione, si può calcolare l'andamento della potenza disponibile per alimentare il carico esterno, e quindi la curva della densità di potenza di una MFC. Questa curva per una MFC ha il tipico andamento parabolico, il massimo della curva di potenza di una data MFC,  $P_{max}$  rappresenta la potenza massima che il sistema è in grado di generare per alimentare i carichi esterni. Generalmente viene misurato il potenziale ai capi della resistenza esterna fissa ( $E_{cell}$ ), mentre la corrente è calcolata utilizzando la Legge di Ohm ( $E_{cell}=I \cdot R_{ext}$ ); quindi la potenza prodotta da una MFC è calcolata come:

$$P = E_{cell} \cdot I = \frac{E_{cell}^2}{R_{tot}}$$

Quindi utilizzando una serie di resistenze tali da coprire alcuni ordini di grandezza attorno al valore di resistenza ohmica interna della cella elettrochimica, è possibile tracciare l'andamento della tensione in funzione della corrente (curva di polarizzazione) che caratterizza una data MFC.

### 1.3.2. Efficienza delle MFCs

L'efficienza della prestazione dipende da molti fattori quali la concentrazione e la natura della specie dell'accettore elettronico, disponibilità di protoni, prestazioni del catalizzatore, materiale usato per la produzione degli elettrodi, il tipo di substrato, fattori ambientali, resistenza esterna ed interna della cella, la composizione della comunità microbica, i mediatori delle reazioni redox, la tipologia della membrana permeabile ionica-selettiva( in caso di MFC dougle-chamber) e tanti altri (71,75). Infatti le MFC posso andare incontro a delle perdite di prestazione che vengono in genere suddivise in perdite di attivazione, perdite ohmiche, perdite metaboliche batteriche e trasporti di massa o perdite di concentrazione (74).

Le perdite ohmiche, ad esempio, sono dovute alla resistenza al movimento degli elettroni e degli ioni attraverso gli elettrodi, alle interconnessioni elettrodi, al circuito esterno, al flusso di protoni e di altri ioni contatori attraverso la membrana permeabile selettiva, quando presente, (76), al contatto elettrico scarso (specialmente agli elettrodi). L'effetto delle perdite ohmiche sulle prestazioni MFC può essere ridotto al minimo riducendo la spaziatura degli elettrodi, utilizzando una membrana di alta qualità (61). Anche il materiali con cui sono fatti gli elettrodi deve essere conduttivo per limitare le perdite ohmiche, biocompatibili e stabili nella soluzione del reattore. Possono essere utilizzate maglie di acciaio inossidabile (il rame non è indicato a causa della sua tossicità). Molto utilizzato è il carbonio sotto forma compatta di grafite in piatti, bacchette o granuli, in forma fibrosa (feltro, tessuto, fibre,). Per migliorare le proprietà catalitiche dell'anodo

si può aumentare l'area superficiale attiva (un aumento del rapporto superficie volume incrementa di due volte la potenza prodotta) (62) o modificare la superficie dell'elettrodi con diverse molecole che agiscono come intermediari di elettroni (come il carbone attivo). Per la scelta del materiale per il catodo può essere costituito da materiale di carbonio (76).

Le perdite di attivazione della polarizzazione è correlate all' energia d'attivazione necessaria per avviare le reazioni redox anodiche e catodiche per il trasferimento iniziale degli elettroni dai microrganismi elettricamente attivi verso gli elettrodi(71). Tali perdite possono essere dovute anche alla natura dei composti sottoposti all'ossidazione nell'anodo in quanto le perdite di attivazione sono inerenti a tutte le reazioni elettrochimiche che avvengono. Le perdite di attivazione in MFC possono essere mitigate aumentando la superficie di elettrodo e aumentando la temperatura ad un livello massimo tollerabile ai microrganismi.

Le perdite metaboliche, invece, dei batteri derivano dalla deviazione dell'energia acquisita da microorganismi (attraverso l'ossidazione del substrato) per la crescita e la manutenzione delle cellule, invece di essere catturata per la produzione di elettricità. Questo effetto si verifica in seguito all'instaurarsi di un'elevata differenza di potenziale redox tra il substrato (donatore di elettroni) e l'anodo (accettazione elettronica temporanea), con maggiore guadagno energetico da parte del microrganismo. Per mitigare questo effetto, il potenziale di anodo dovrebbe essere abbastanza basso per ridurre al minimo le perdite metaboliche, ma non troppo basso per evitare che i batteri passino ad un metabolismo fermentativo e/o ad accettori alternativi di elettroni (come i solfati, i nitrati) (71).

Le perdite di energia in MFC sono graficamente descritte in grafici di polarizzazione. Nelle celle elettrochimiche, le prestazioni del sistema vengono valutate periodicamente tramite curve di polarizzazione, la densità di potenza, l'efficienza columbica, l'efficienza energetica, la voltammetria ciclica (CV).

### 1.3.3. Tipologie di MFC

Recentemente c'è stato un intensivo sviluppo della ricerca in riguardo alla progettazione e costruzione delle MFC per superare fattori che limitano le loro prestazioni. Ci sono diversi tipi di modelli MFC in base alla geometria del reattore, i materiali utilizzati negli elettrodi e per la camera, la presenza / assenza di una membrana cationica di scambio, l'applicazione di un potenziale esterno, la natura delle reazioni catodiche (77). E' possibile avere MFC a camera singola (single -chamber), a due camere (two-chambers) o a sistemi multi-camera (multi-chambers) a seconda delle loro applicazioni.

**Il sistema a due camere** è presentano una separazione fisica tra il compartimento anodico e catodico. Nel primo si esclude totalmente il contatto con l'ossigeno, mentre nel secondo vengono esclusi i prodotti di scarto del metabolismo microbico ad eccezione dei ioni  $H^+$ . La separazione avviene di solito con membrana PEM (Proton Exchange Membrane). In questo modo si evitano contaminazioni del catodo da parte di microrganismi che vi possono aderire e di metaboliti che possono comportarsi come accettori finali di elettroni. Un tradizionale configurazione è quella di tipo H costituita, appunto, da camere anodiche e catodiche separate da un separatore (ad esempio membrana ionica selettiva permeabile o ponte di sale). Ci sono diverse tipologie, comunque di MFC two-chambers, in base alla superficie dell'elettrodo, la densità volumetrica, la distanza tra le due camere e, quindi, i due elettrodi, la forma (ad esempio cilindrica, rettangolare, cubica). La maggior parte dei sistemi richiedono che il catodo venga costantemente aerato per mantenere la disponibilità di ossigeno per le reazioni di riduzione. Alcune volte la ferricianide (62) o altri agenti ossidanti, che possono fungere da accettori di elettroni (come il perossido di idrogeno), possono essere impiegati per evitare l'aerazione del catodo che richiede energia (78). Inoltre le reazioni che avvengono nelle due differenti camere non sono selettive, i reagenti prodotti in esse, potrebbero influenzare negativamente le prestazioni della cella. È possibile quindi allontanare gli elettrodi per abbassare la diffusione dei reagenti tra le camere (79), ma questo aumenta la resistenza ohmica. L'alternativa è l'utilizzo di una membrana, in grado di trasportare

velocemente e selettivamente i protoni dall'anodo verso il catodo senza introdurre delle elevate resistenze interne al sistema. I materiali più utilizzati per le PEM (Proton Exchange Membrane) sono il Nafion® della DuPont,. Tali membrane presentano una bassa selettività verso i protoni e trasferiscono altri cationi. Quindi i protoni si accumulano a livello del catodo dove vengono coinvolti nella reazione di riduzione. Oltre alle membrane PEM ci sono le membrane anioniche (AEM) che sono in grado di tamponare l'aumento del pH come conseguenza della loro proprietà di trasporto di elettroni (76), inoltre la potenza prodotta e l'efficienza coulombica è maggiore rispetto a quelli ottenibili con una membrana PEM (63).

I sistemi a due camere solo utili per le applicazioni pilota e a livello industriali, lo svantaggio è che possono risultare complesse nella realizzazione, con una generazione di energia ridotta risultante da elevata resistenza interna eccessiva oltre ad essere costose.

Pertanto, le **MFC a camera singola**(single-chamber) sono state sviluppate per evitare questa complessità e migliorare la generazione di energia. In queste tipologie di celle non vi è una separazione netta tra compartimento anodico e catodico. L'anodo è immerso nel substrato (riducente) escluso quasi completamente dal contatto con l'ossigeno (ossidante). Il catodo, invece è solo parzialmente immerso nel substrato, con la parte non immersa esposta all'aria. Il trasferimento dei protoni dal compartimento anodico al catodico non è selettivo, quindi è possibile trovare al catodo oltre a ioni  $H^+$  anche altri cationi e metaboliti di scarto che si possono comportare da accettori di elettroni (71).

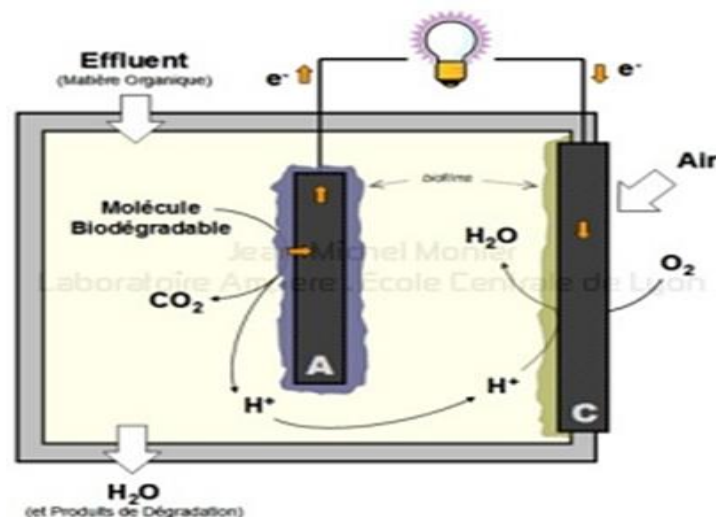


Fig.1.3.3. 1: Single-Chamber

Le MFC di tipo singolo sono più efficienti ed economiche rispetto a quelle a due camere. Infatti nei sistemi MFC single-chamber c'è un'elevata flessibilità e versatilità nelle configurazioni del reattore per soddisfare le esigenze richieste. Inoltre la distanza tra gli elettrodi è molto ridotta e non c'è neanche bisogno, di solito, di input energetici per l'aerazione del catodo in quanto già a contatto con l'aria (65). Quindi questi sistemi, rispetto a quelli a two-chambers, danno prestazioni di potenza più elevate e sono più sostenibili.

Un esempio di applicazione delle MFC single-chamber è nella bonifica di sedimenti contaminati da metalli pesanti o da idrocarburi. In questo sistema l'anodo è inserito nel sedimento marino e collegato, tramite un circuito esterno, al catodo immerso nell'acqua sovrastante (80). Qui, non essendoci separazione tra compartimento anodico e quello catodico, i protoni, rilasciati dalle reazioni d'ossidazione del substrato operate dai batteri presenti nei sedimenti, sono condotti dall'acqua di mare attraverso l'interfaccia di sedimento-acqua. Questo sistema, oltre ad essere impiegato nella bonifica di sedimenti contaminati può alimentare, mediante l'uso di condensatori, dei dispositivi per il monitoraggio ambientale (80,81).

#### *Sistemi MFC multi-camera*

Nelle applicazioni industriali in campo, le MFC devono essere collegate in serie o in parallelo come un sistema impilato per un notevole aumento della produzione di energia elettrica (82).

Tuttavia, una delle principali difficoltà incontrate nei sistemi MFC impilati è l'inversione di tensione che potrebbe essere dovuta alla perdita di attività microbica risultante dalla carenza di carburante / substrato e / o da un'aumento della resistenza interna quando viene applicata una bassa resistenza esterna.

L'inversione di tensione può essere limitata efficacemente collegando le MFC ad un condensatore o utilizzando elevati resistenze esterni in singole unità (83).

A differenza di altri processi di biorisanamento, le MFC dimostrano efficacia sia in condizioni aerobica che in ambiente anaerobico (70). Inoltre hanno costi più contenuti ed un risparmio di energia maggiore rispetto ad altre soluzioni tecniche. Sono risultate vantaggiose ed efficienti nel trattamento delle acque di scarico e hanno un notevole potenziale anche per il trattamento del suolo e dei sedimenti contaminati da metalli pesanti e composti organici come gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) (84). La degradazione del IPA da matrice solida è stata ottenuta in MFC a single-chamber, con entrambe le condizioni aerobiche e anaerobiche (70). Infine le MFC sono ecocompatibili, biocompatibili, versatili e portano alla produzione, non solo di energia, ma anche di altri prodotti utili (combustibili e prodotti chimici).

Quindi le MFC possono fornire servizi preziosi per le nostre comunità urbane.

#### **1.3.4. Applicazioni MFC in bioremediation**

MFC è una tecnologia emergente, sono stati utilizzati infatti con successo per il trattamento di acque reflue organiche e inorganiche provenienti da diverse fonti (85), con riduzioni elevate di COD nell'intervallo 85-95% e di inquinanti inorganici (83). Grazie a questi risultati incoraggianti le MFC sono state impiegate anche nei processi di bioremediation di vari tipi di matrici ambientali (suolo, acque sotterranee, sedimenti) contaminanti da diverse tipologie di composti quali quelli organici aromatici (86) ai metalli pesanti e inquinanti inorganici come nitrati e composti di fosfati (87).



In numerosi studi le MFC hanno mostrato di essere capaci di degradare e detossificare, in modo efficace, anche siti contaminate da recalcitranti quali gli idrocarburi come gli IPA con un buon recupero di energia.

Le MFC sono uniche nel senso che i microrganismi sono in grado di trasferire elettroni extracellularmente ad un materiale solido come un elettrodo di anodo rispetto ai meccanismi intracellulari del metabolismo microbico osservato, ad esempio, nei bioreattori.

Essendo una nuova tecnologia, le MFC sono ancora soggette a molti studi, soprattutto in riguardo ai loro limiti ad esempio basso tasso di crescita microbica, inversione elettronica, concorrenza tra accettori di elettroni diversi dall'ossigeno (ad esempio nitrati e solfati), alti costi dei materiali, ad es. l'uso del platino come catalizzatore al catodo, acidificazione dell'anodo, a causa di gradienti del pH, ( che si verifica in MFC two-chambers che hanno membrane poco performanti) che può inibire l'attività microbica o aumentare il potenziale dell' anodo, non biodisponibilità del substrato(ad esempio IPA insolubili), comprensione dei processi coinvolti nel trasferimento di elettroni. Ad esempio, l'uso del tampone di fosfato negli anodi aiuta a mantenere il pH neutro ma solo per brevi periodi. Per la biodisponibilità, è un problema presente soprattutto con composti complessi e poco solubili come gli IPA, ma, mediante l'impiego di tensioattivi (Tween 80) o di microrganismi che producono tensioattivi (come *Pseudomonas* spp), tale problema può essere tamponato.

Altri fattori che influenzano le prestazioni di MFC sono il tipo di inoculo batterico, la natura e concentrazione del substrato e fattori ambientali (come temperatura e salinità).

Negli ultimi anni la tecnologia MFC è sempre più considerata per la bonifica di sedimenti e terreni contaminati da idrocarburi, inclusi gli IPA, con risultati significativi anche in vista di un'applicazione in campo (88)

## 2. SCOPO DELLA RICERCA

A causa della crescente contaminazione degli ecosistemi terrestri ed acquatici da idrocarburi policiclici aromatici (IPA), che costituisce uno degli scenari più ricorrenti (Pannu *et al.* 2004) e preoccupante a causa della loro elevata persistenza, ubiquità, proprietà tossiche e attività cancerogena(9), la comunità scientifica sta concentrando la sua attenzione alla ricerca di nuove tecnologie per risolvere questo rilevante problema.

Tra le diverse tecnologie disponibili per la bonifica dei siti contaminati quelle biologiche (biorisanamento) risultano le più favorevoli sia dal punto di vista economico che applicativo. Nel corso degli anni, questi processi hanno dimostrato la loro efficienza (ma anche le loro limitazioni) nella rimozione degli idrocarburi petroliferi in particolare modo degli IPA. Recentemente, nell'ambito della ricerca su questi meccanismi, sempre più peso stanno acquisendo la tecnologia delle celle a combustibile microbica (MFC).

Infatti negli ultimi anni, le MFCs hanno dimostrato di poter trasformare i rifiuti organici in elettricità attraverso reazioni elettrochimiche catodiche ad opera dei microrganismi(89), di operare con successo nel trattamento di acque reflue organiche e inorganiche provenienti da diverse fonti (85), di avere un grande potenziale nella bonifica dei sedimenti inquinati con idrocarburi aromatici, con recupero di energia parziale in forma di produzione di energia elettrica (7).

Per il presente lavoro di ricerca sono stati prefissati diversi obiettivi conducendo diverse prove su scala di laboratorio:

**Obiettivo 1:** Verificare il ruolo dell'elettrogenesi nel migliorare l'attività degradativa e detossificante di un consorzio microbico nel trattamento di una matrice liquida altamente contaminata da IPA. Sono stati condotti due esperimenti in parallelo. In un esperimento è stata utilizzata una microflora, specializzata nella degradazione degli IPA, isolata da un'ambiente antropizzato (pulviscolo prelevato da una galleria esposta a intenso traffico veicolare) fortemente

inquinato da idrocarburi, soprattutto IPA, e precedentemente testata in un esperimento di *bioremediation* con bioreattori presso il Laboratorio di Igiene del Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" (37,90). Nell' altro esperimento è stata impiegata una microflora endogena, isolato da matrice ambientale con una contaminazione medio-bassa da IPA (sedimenti marini provenienti da zona portuale), di cui non erano note le sue capacità di remediation.

Per effettuare tale valutazione è stato realizzato un sistema, in lab-scale, composto da unità di bioreattore e di celle a combustibile microbiche MFC (*Microbial Fuel Cell*).

**Obiettivo 2:** Applicazione di Sediment Microbial Fuel Cell (SMFC), in lab-scale, per il biorisanamento di sedimenti marini, provenienti dall' ex zona industria di Bagnoli (quartiere di Napoli) e risultanti altamente contaminati da IPA. Verificare, quindi, l'efficacia di questo sistema di bonifica nel degradare gli IPA e detossificare i sedimenti marini contaminati, con concomitante generazione di energia elettrica.

L'efficienza delle MFC, nei diversi esperimenti, è stata valutata in termini di rimozione degli IPA, mediante analisi chimiche; di detossificazione, con saggi ecotossicologici: di potenza, corrente massima prodotta e efficienza columbica; e di composizione della microflora, tramite analisi microbiologiche. Le analisi ecotossicologiche permettono di valutare l'andamento della tossicità ambientale, invece le analisi chimiche permettono di stabilire l'efficienza del processo degradativo sugli IPA. Infine le analisi elettroniche permettono di valutare le prestazioni di una MFC.

Le analisi chimiche dell'obiettivo 1, sono state condotte dal laboratorio ACE di Chimica analitica, diretta dal prof. Marco Trifuoggi, facente parte del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Napoli Federico II.

Invece le analisi chimiche dell'obiettivo 2 sono state svolte, durante un periodo di formazione all'estero, presso il Department of Thematic Studies - Environmental Change, Linköping University(Sweden), in collaborazione con il prof. Joyanto Routh.

In collaborazione con il Dipartimento di Ingegneria e il Dipartimento di Scienze e Tecnologie (DIST) dell'Università degli Studi di Napoli "Parthenope", è stato sviluppato il layout delle celle a combustibile microbiche (o Microbial Fuel Cells), progettato e realizzato il sistema d'acquisizione degli outputs elettrici.

## 3. MATERIALE E METODI

### 3.1 OBIETTIVO 1

#### 3.1.1. IPA utilizzati

Gli IPA utilizzati negli esperimenti e presi in esame sono stati:

- Naftalene, in quanto è uno dei più diffusi
- Fenantrene, pirene e benzo(a)pirene, in quanto rappresentativi dei 16 definiti “inquinanti prioritari” dalla EPA.

Per ogni IPA utilizzato nel presente lavoro, è stata preparata una soluzione in acetone alla concentrazione di 8 mg/mL. Tali soluzioni sono state preparate per rendere il più omogenea possibile la distribuzione degli IPA nelle matrici utilizzate per gli esperimenti, in quanto questa classe di molecole è di natura fortemente idrofobica.

#### Naftalene

L'IPA più semplice strutturalmente è il naftalene, con formula chimica  $C_{10}H_8$ . È una molecola planare a due anelli benzenici fusi. Come inquinante, si trova per lo più in forma gassosa a temperatura ambiente. Il principale uso commerciale del naftalene è ottenere altre sostanze chimiche utilizzate per la produzione di cloruro di polivinile (PVC). È anche usato come repellente per tarme (Naftalina).

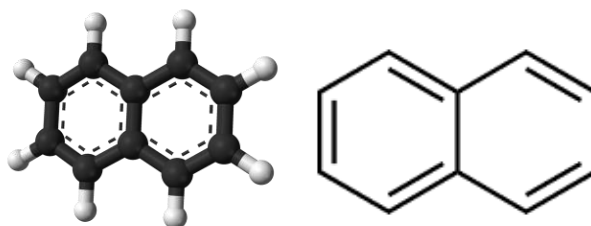


Fig. 3.1.1. 1 Naftalene.

### **Proprietà fisiche:**

- solido cristallino bianco o liquido con odore caratteristico. Valore soglia nell'aria 0,003-0,084 ppm, mentre nell'acqua 0,21 mg/L.
- Peso molecolare: 128,17.
- Punto di fusione: 80°C; oltre questa temperatura sublima in maniera apprezzabile.
- Punto di ebollizione: 218°C a 760 mmHg.
- Densità: 1,162 g/mL a 20°C; 1,15 g/mL a 25°C.
- Tensione di vapore: 0,05 mmHg a 20°C; 1 mmHg a 52,6°C; 0,23 mmHg a 25°C.
- Solubilità: in acqua: < 1 mg/mL a 22°C; 30 ppm. In altri solventi (a 22°C): dimetilsolfossido e acetone circa 100 mg/mL; etanolo (95%) 10-50 mg/mL. Solubile inoltre in metanolo (1 g/13 mL), cloroformio e tetracloruro di carbonio (1 g/2 mL), alcool assoluto e altri solventi organici; molto solubile in etere, idronaftalene,; scarsamente solubile in etere di petrolio.

### **Proprietà chimiche:**

Il naftalene è un composto incompatibile con gli agenti ossidanti. Reagisce violentemente con il pentossido di diazoto, con CrO<sub>3</sub> e con cloruro di alluminio + cloruro benzoile. La sua forma fusa (oltre 110°C) può produrre, a contatto con l'acqua, una reazione violenta con produzione di schiuma o formazione di composti altamente reattivi. Inoltre, allo stato fuso, attacca alcune plastiche e gomme. Il naftalene è sensibile al calore, si infiamma a 88°C ed è combustibile. Volatilizza apprezzabilmente a temperatura ambiente. Soluzioni in etanolo al 95% o acetone dovrebbero essere stabili per 24 ore in normali condizioni di laboratorio. Se riscaldato fino alla temperatura di decomposizione emette fumi irritanti e tossici di monossido e biossido di carbonio.

### **Genotossicità:**

E' risultato negativo in saggi per l'induzione di mutazioni geniche in ceppi di *Salmonella typhimurium*. In prove citogenetiche con cellule ovariche di cavie, il naftalene ha indotto scambi fra cromatidi fratelli con e senza attivazione. L'esposizione al naftalene ha determinato inoltre un significativo incremento di aberrazioni cromosomiche in cellule ovariche di cavie in presenza di attivazione.

**Cancerogenicità:**

A seguito delle prove di cancerogenicità eseguite nel 1990 e nel 1991, il naftalene è stato definito come probabile cancerogeno per l'uomo. Queste prove hanno dimostrato che il naftalene non ha prodotto attività cancerogena in maschi di topo esposti per inalazione a concentrazioni di 10 e 30 ppm del composto per 6 ore al giorno e per 5 giorni alla settimana per 103 settimane. Tuttavia, le femmine trattate allo stesso modo hanno evidenziato un incremento dell'incidenza degli adenomi polmonari e alveolo-bronchiolari (dati EPA).

**Teratogenicità:**

Vi sono insufficienti dati riguardo alla capacità del naftalene di alterare lo sviluppo fetale.

**Tossicità acuta:**

Risulta tossico per l'uomo se ingerito e/o inalato. È anche pericoloso se assorbito attraverso la pelle. Il naftalene è moderatamente tossico per via sottocutanea. La  $DL_{50}$  orale per i ratti è di 1780 mg/kg, la  $DL_{50}$  sottocutanea per i topi è di 969 mg/kg, la  $DL_{50}$  intravenosa per i topi è di 100 mg/kg.

**Valori limite:**

PEL-TWA (OSHA): 10 ppm per un turno lavorativo di 8 ore. STEL (OSHA): 15 ppm. TLV-TWA (ACGIH): 10 ppm che equivale a  $50 \text{ mg/m}^3$ . STEL (ACGIH): 15 ppm, ossia  $75 \text{ mg/m}^3$ .

In caso di ingestione si possono verificare irritazione delle mucose, nausea, cefalea, vomito, ematuria, febbre, convulsioni, coma, dolori addominali. Se inalato, può provocare irritazione delle alte vie respiratorie, respiro breve e sibilante, tosse, confusione. Invece, in caso di contatto cutaneo e oculare si hanno irritazioni, arrossamento, dermatiti, eritema. congiuntivite, disturbi visivi.

Degradazione: il naftalene è moderatamente solubile in acqua. Concentrazioni comprese fra 1 e 1000 mg solubilizzano facilmente in 1 litro di acqua. L'emivita in acqua va da 2 a 20 giorni.

Circa il 96% del naftalene si disperde nell'aria, il 3% nell'acqua e circa lo 0,5% nei suoli terrestri e nei sedimenti acquatici. Nell'atmosfera il naftalene si fotodegrada rapidamente, con un'emivita di 3-8 ore. La principale sorgente di naftalene nell'aria è rappresentata dalle aree a traffico sostenuto o dove vi siano esalazioni di carburante o in prossimità di raffinerie di petrolio.

## Fenantrene

Il fenantrene è composto da tre anelli benzenici fusi,  $C_{14}H_{10}$ , con cinque possibili strutture di risonanza. È affine all'antracene, infatti hanno la stessa formula bruta, ma differente formula strutturale (fenantrene e antracene sono isomeri). È insolubile in acqua, mentre è solubile in etere. Il fenantrene ha origine dalla combustione di diverse sostanze organiche ed è presente nel fumo di sigaretta. Viene utilizzato, inoltre, nella produzione di pesticidi e resine. L'esposizione della popolazione al fenantrene si ha principalmente attraverso il consumo di cibi contaminati con prodotti di combustione come cibi arrostiti ed affumicati.

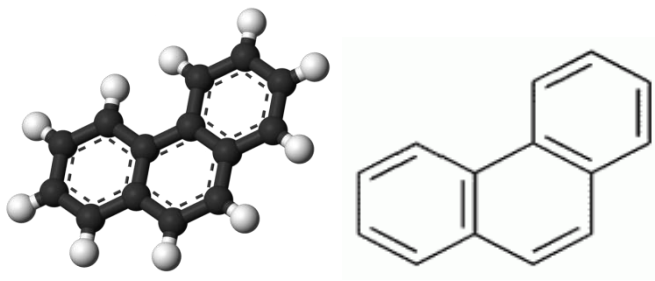


Fig. 3.1.1. 2: Fenantrene

### Proprietà fisiche:

- Aspetto fisico: polvere cristallina bianca.
- Peso molecolare: 178,24.
- Punto di fusione: 100°C.
- Punto di ebollizione: 339°C a 760 mmHg.
- Tensione di vapore: 1 mmHg a 20°C.
- Solubilità: in acqua: <1 mg/mL a 26°C. In altri solventi: molto solubile in toluene; solubile in DMSO, etere, etanolo, acetone.



**Cancerogenicità:**

In uno studio di induzione di tumori mammari, singole dosi orali di 200 mg di fenantrene somministrate con alimentazione a ratti femmine Sprague-Dawley, non hanno indotto tumori nei 60 giorni dopo il trattamento. Non è stato riscontrato alcun tumore in topi trattati con una soluzione di fenantrene in benzene (dose e frequenza di trattamento non specificati) per un periodo di 9 mesi. Anche l'applicazione dermica di fenantrene al 5% per un periodo di tempo che va da 3 settimane a 1 anno, non ha provocato nei topi l'induzione di tumori della pelle.

**Tossicità acuta:**

L'esposizione acuta può determinare nausea, mal di testa, vertigini e debolezza. Si è visto che il fenantrene causa emolisi dei globuli rossi. È riportata una  $DL_{50}$  orale per topi di 750 mg/kg. Singole dosi di 100 mg/kg/giorno di fenantrene somministrate con alimentazione forzata per 4 giorni hanno determinato la soppressione dell'attività carbossilesterasica nella mucosa intestinale di ratti, ma non hanno prodotto altri segnali di tossicità gastrointestinale. Il fenantrene non ha effetti sull'attività carbossilesterasica epatica o extraepatica. La  $DL_{50}$  orale per i topi è 700 mg/kg.

**Tossicità cronica:**

Un aumento nell'incidenza del cancro a polmoni, vescica e reni può essere dovuto all'esposizione a composti carboniosi volatili. Non sono disponibili informazioni sulla tossicità orale cronica di fenantrene nell'uomo o in animali.

**Valori limite:** PEL (OSHA):  $0,2\text{mg/m}^3$ .

In seguito ad ingestione si possono avere effetti corrosivi sul sistema gastrointestinale, invece con l'inalazione si verificano irritazione delle membrane della mucosa, nausea, mal di testa, vertigini e debolezza. Il contatto cutaneo ed oculare comporta dermatiti, gravi irritazioni e bruciori agli occhi.

## Pirene

Il pirene è costituito da 4 anelli benzenici condensati,  $C_{16}H_{10}$ , e si forma durante la combustione incompleta dei composti organici. Viene utilizzato nella produzione di coloranti e loro precursori (ad esempio la piranina). È un composto tossico per i reni e per il fegato.

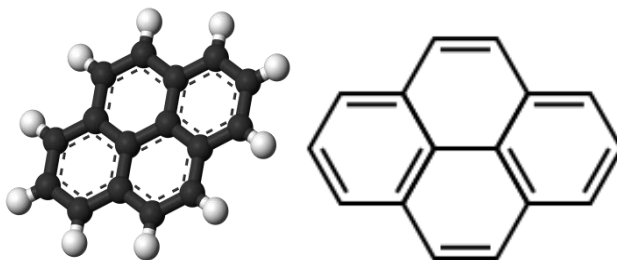


Fig. 3.1.1. 3: Pirene

### Proprietà fisiche:

- Aspetto fisico: cristalli prismatici monoclini, incolori se puri, giallo chiaro se impuri (con tetracene).
- Peso molecolare: 202,26.
- Punto di fusione: 156°C.
- Punto di ebollizione: 393°C a 760 mmHg.
- Densità: 1,271 g/mL a 23°C.
- Tensione di vapore: 2.60 mmHg a 200.4°C; 6.90 mmHg a 220.8°C; 18.30 mmHg a 242.7°C.
- Solubilità: In acqua: < 1 mg/mL a 22°C. In altri solventi (mg/mL a 22°C): etanolo (95%) < 1; acetone 50-100. È solubile inoltre in toluene, etere e benzene. Inoltre è completamente solubile nei solventi organici.

### Proprietà chimiche:

Il pirene reagisce con ossidi di azoto a formare nitroderivati, nonché con acido nitrico. In normali condizioni di laboratorio è stabile, così come sono stabili soluzioni in acqua, in etanolo (95%) e acetone se tenute per 24 ore in normali condizioni di laboratorio. E' comunque un composto combustibile. Allo stato solido o in soluzione presenta una leggera fluorescenza bluastra. Non

subisce foto-ossidazione in solventi organici. Riscaldato fino a decomposizione emette fumi con odore pungente.

### **Genotossicità:**

In esperimenti sul DNA di *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, il pirene si è rivelato incapace di produrre mutazioni. Altre prove su geni di cellule batteriche hanno dato esito sia positivo che negativo. Il pirene non ha indotto aumenti di mutazioni recessive letali legate al sesso in *Drosophila*. Risultati discordanti sono stati pure ottenuti da esperimenti condotti su cellule in vitro di mammiferi (dati EPA).

### **Cancerogenicità:**

I dati sperimentali sulla cancerogenicità del pirene non sono conclusivi. Questo composto non è classificabile come cancerogeno umano.

### **Tossicità acuta:**

L'esposizione per l'uomo può derivare sia da inalazione di aria contaminata, sia da consumo di cibo (tipo cibi affumicati) e acqua inquinata, sia con il fumo di sigaretta. Nei ratti l'inalazione del pirene ha causato danni epatici, polmonari e gastrici, mentre l'assorbimento cutaneo per 10 giorni ha prodotto iperemia, perdita di peso e anomalie ematopoietiche; per 30 giorni hanno prodotto dermatiti.

### **Tossicità cronica:**

In uno studio di 13 settimane maschi e femmine di topo (20/sex/gruppo) sono stati trattati per intubazione gastrica con 0, 75, 125 e 250 mg/kg/giorno di pirene mescolato ad olio di mais. In alcuni animali sono stati osservati casi di nefropatia, caratterizzata dalla presenza di focolai multipli di rigenerazione tubulo-renale, spesso accompagnata da infiltrazioni di linfociti interstiziali e/o da focolai di fibrosi interstiziale. Il peso relativo e assoluto dei reni si è rivelato

ridotto negli animali trattati con la dose più alta. In base a questi risultati il NOAEL è stato di 75 mg/kg/giorno e il LOAEL di 125 mg/kg/giorno (dati EPA).

**L' esposizione dell'uomo al pirene può causare** respiro breve e sibilante, tosse, irritazione delle alte vie respiratorie per inalazione; arrossamento ed irritazioni per contatto cutaneo ed oculare

### **Degradazione nel suolo:**

il rilascio di pirene nell'ambiente è molto diffuso poiché questo composto è un prodotto comune di combustione incompleta. È largamente associato a particolato, particelle di suolo e sedimenti. Sebbene le maggiori concentrazioni si abbiano nei pressi delle fonti di emissione, la sua presenza in luoghi anche molto distanti da esse indica che il pirene è piuttosto stabile nell'atmosfera e che è capace di essere trasportato a lunga distanza. Infatti nell'aria può subire fotolisi diretta, ma l'adsorbimento al particolato ritarda tale processo. Liberato nell'acqua viene adsorbito molto fortemente dai sedimenti e dal particolato, si bioconcentra da leggermente a moderatamente negli organismi acquatici, ma non subisce idrolisi. Nei pressi della superficie delle acque può subire una significativa biodegradazione e una diretta fotolisi. L'adsorbimento ai sedimenti limita l'evaporazione. Se liberato nel suolo si ritiene venga fortemente adsorbito dalle particelle di terreno dove può comunque biodegradarsi in buona parte.

### **Benzo(a)pirene**

E' una molecola costituita da cinque anelli benzenici condensati,  $C_{20}H_{12}$ . Tale composto ha origine dalla combustione di molti prodotti contenenti molecole pesanti ( fumo di sigaretta, combustione dei rifiuti indifferenziati, scarico dei motore Diesel e di tutti i motori alimentati con combustibili pesanti) , può formarsi anche nella combustione del legname. È uno dei primi IPA di cui si è stata accertata la cancerogenicità. Disciolta in acqua, è tra le sostanze più pericolose. Il limite di concentrazione è intorno agli 0,01 mg/L.

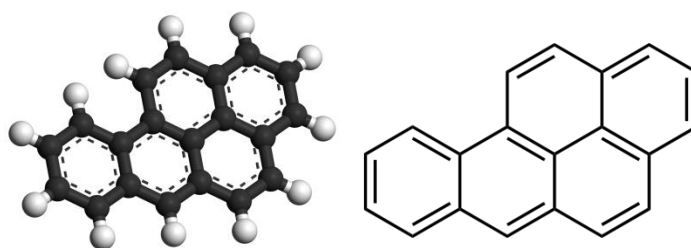


Fig. 3.1.1. 4: Benzo(a)pirene.

### Proprietà fisiche:

- Aspetto fisico: polvere cristallina giallastra con debole odore aromatico.
- Peso molecolare: 252,32.
- Punto di fusione: 176,5–177,5°C.
- Punto di ebollizione: 475°C a 760 mmHg.
- Densità: 1,351 g/mL.
- Tensione di vapore: 2,60 mmHg a 200,4°C; 6,90 mmHg a 220,8°C; 18,30 mmHg a 242,7°C.
- Solubilità: in acqua: < 1 mg/mL a 17°C. In altri solventi (mg/mL a 17°C): etanolo (95%) < 1; acetone 10-50. Solubile in benzene, etere.

### Proprietà chimiche:

Il benzo(a)pirene è incompatibile con i forti ossidanti; esso viene interessato rapidamente da nitrificazione e alogenazione. Può, però, reagire con gli ossidanti organici ed inorganici inclusi vari elettrofili, perossidi, ossidi di azoto e ossidi di zolfo. Non è infiammabile. Esso subisce foto-ossidazione per irradiazione con luce solare o con fluorescenza in solventi organici. Le soluzioni di benzo(a)pirene in benzene si ossidano per influenza della luce e dell'aria. Le soluzioni in acqua, dimetilsolfossido, etanolo al 95% o acetone possono rimanere stabili per 24 ore in condizioni normali di laboratorio. Se riscaldato fino a decomposizione emette fumi tossici e densi di monossido e biossido di carbonio.

**Genotossicità:**

Il benzo(a)pirene si è dimostrato genotossico in un varietà di prove su cellule procariotiche ed eucariotiche. Nei procarioti il composto è risultato positivo nelle prove di danneggiamento del DNA nonché di reversione e mutazione. In cellule di mammifero è risultato positivo nelle prove di danneggiamento, di mutazione, di effetti sui cromosomi e di trasformazioni cellulari (dati EPA).

**Cancerogenicità:**

il benzo(a)pirene è un probabile agente cancerogeno per l'uomo. Vi sono alcune prove che esso possa causare tumori alla pelle, ai polmoni e alla vescica sia nell'uomo che negli animali.

**Tossicità cronica:**

I dati disponibili si basano su studi effettuati su roditori ed alcuni primati. Somministrazioni ripetute di benzo(a)pirene sono state associate con l'incremento dell'incidenza sia di tumori generali che relativi alla zona trattata.

**Valori limite:** PEL-TWA (OSHA):  $0,2 \text{ mg/m}^3$  per un turno lavorativo di 8 ore. TLV-TWA (ACGIH):  $0,2 \text{ mg/m}^3$

**Nel caso di ingestione può provocare** irritazione delle mucose. Invece con l'inalazione comporta respiro breve e sibilante, tosse, irritazione delle alte vie respiratorie, bronchite.

Arrossamenti, irritazioni, eritemi, congiuntivite, si riscontrano in seguito a contatto cutaneo e oculare.

**Degradazione nel suolo:**

Il benzo(a)pirene è un composto facilmente rinvenibile associato al particolato, al suolo e ai sedimenti poiché si tratta di un prodotto che si forma a seguito di una combustione incompleta. Nell'aria subisce fotolisi diretta, anche se l'adsorbimento sul particolato può ritardare questo processo. Se rilasciato in acqua esso viene adsorbito molto velocemente dai sedimenti e al

particolato, si bioconcentra negli organismi acquatici che non lo metabolizzano. Nelle acque superficiali esso è soggetto a fotolisi. Nel suolo sembra che venga adsorbito molto fortemente dai sedimenti e non liscivi in maniera significativa nelle acque sotterranee, inoltre può essere soggetto a biodegradazione

### **3.1.2. Isolamento e identificazione consorzio microbico**

A 10 g di campione sono stati aggiunti 90 mL di soluzione fisiologica (0,9% p/v di NaCl), seguito da miscelazione meccanica per 2 minuti, attraverso uno omogeneizzatore a sbattimento (Stomacher® 400 circulator, Seward U.K.), in maniera tale da trasferire, in fase liquida, i batteri eventualmente adesi alla fase solida, da cui sono state preparate le opportune diluizioni in base decimale scalari. Successivamente, e' stata effettuata la tecnica dell'inclusione su NUTREINT AGAR (Oxoid™), per il campione proveniente dalla galleria, e MARINE AGAR BASE(Oxoid™), per il campione di sedimento marino da zona portuale. Le piastre sono state incubate a 22°C per 72h. In seguito, sono state isolate le colonie predominanti mediante analisi morfologica.

### **3.1.3. Estrazione del DNA e PCR**

Al fine di estrarre il DNA batterico, si è proceduto alla preparazione del campione a partire da singole colonie pure poste in 25 µL di 50 µl di Milli-Q Type 1 Ultrapure Water contenuti in eppendorf da 0,5 mL . Il DNA viene estratto mediante denaturazione a 96 ° C per 10 minuti e poi centrifugazione a 10.000 giri / min per 10 min a 4 ° C (Ivanov e altri 1987). Il sopranatante è stato recuperato e usato per la reazione a catena della polimerasi (PCR). Le reazioni PCR sono state effettuate in un TECHNE Prime Thermal Cycler. Il DNA batterico è stato amplificato usando primers universali PCR, complementari alle regioni V3 e V6 (16S rDNA) (Chakravorty e altri 2007). L'oligo selezionato era V3\_F (5' CCAGACTCCTACGGGAGGCAG-3 ') e V6\_R (5'-TCGATGCAACGCGAAGAA-3'). Una tipica reazione di 25 µl di PCR conteneva 50 µM di ciascun primer invA, 0,2 µM di ciascun dNTP (VWR Chemicals), PCR Triton Free (Tris-HCl

pH 8,5, KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> - VWR Chemicals), 1u VWR Taq DNA polimerasi (VWR Chemicals) e 0,5 µL di DNA campione. Le condizioni di incubazione sono state 95 ° C per 2 min (denaturazione iniziale), seguita da 30 cicli di 95 ° C per 30 s, 55 ° C per 30 s e 72 ° C per 45 s. È stata impiegata un'estensione finale di 72 ° C per 5 minuti. I prodotti amplificati sono stati visualizzati e analizzati per dimensione su gel agarosio (1,5%), colorati con GelRed (Stain Gel Gel Nucleico - BIOTIUM) usando la scala del DNA da 100 bp come riferimento. I campioni così preparati sono stati inviati all'azienda BioFab per purificazione e sequenziamento. I dati di sequenza ottenuti sono stati confrontati con quelli disponibili nel database di sequenza NCBI.

### **3.1.4. Test di degradazione in vitro**

Per constatare la capacità dei batteri di degradare gli IPA è stato preparato un terreno di coltura composto da soluzione di Winogradsky e Agar Batteriologico (AB), avente come unica fonte di carbonio gli IPA considerati. Questo terreno di coltura è caratterizzato da un'elevata chiarezza e il ridottissimo contenuto di minerali che lo rende ideale per la diffusione di sostanze organiche.

La soluzione di Winogradsky è una soluzione salina preparata ad una concentrazione stock 200X, opportunamente diluita al momento della preparazione dei terreni.

La soluzione stock, per litro di acqua bidistillata, contiene i seguenti sali minerali:

- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50g/L
- MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 25g/L
- NaCl 25g/L
- FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 1g/L
- Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>O 1g/l
- MnSO<sub>4</sub> 4 H<sub>2</sub>O 1g/L

Il pH della soluzione deve essere intorno al valore  $7.2 \pm 0,1$ , portato con l'aggiunta di NaOH,.

La soluzione di Winogradsky, utilizzata per la preparazione dei terreni, è stata preparate nel seguente modo:



- 1) la soluzione stock diluita ponendo 5 mL di tale soluzione in 995 mL di acqua bidistillata
- 2) aggiunta di 0,1g di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ad un litro di soluzione di Winogradsky diluita.
- 3) aggiunta di 5ml di trace metal solution, sempre ad un litro di tale soluzione

La trace metal solution è composta:

- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  200mg/L
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10mg/L
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  3mg/L
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20mg/L
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1mg/L
- $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2mg/L
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  500mg/L
- $\text{H}_3\text{BO}_3$  300mg/L

Per effettuare il test di degradazione, il terreno di coltura, in piastra sterile Petri Ø 90 mm, è stato suddiviso in due strati, con composizioni differenti. Lo strato inferiore è stato preparato con:

- Soluzione di Winogradsky diluita agarizzata con l'aggiunta di AB al 1,5% p/v
- Soluzione vitaminica contenente acido folico e vitamina B12(cofattori necessari per la crescita dei microorganismi), è stata aggiunta al terreno, dopo autoclavaggio, in quantità di 0,1mL/L
- Soluzione di cicloesimide in acetone (0,01% p/v) per inibire la crescita di muffe, è stata aggiunta al terreno in 0,1g.

Lo strato superiore è stato preparato con:

- Soluzione di Winogradsky diluita, a cui è stato aggiunto agar batteriologico all'1% p/v. Il terreno ottenuto è stato opportunamente autoclavato. Il pH finale è stato  $7,00 \pm 0,2$ .
- Soluzione di IPA sciolta in acetone (8mg/mL), aggiunta al terreno in quantità di 0,4 mL.

Lo strato superiore è stato piastrato su quello inferiore una volta che quest' ultimo si è solidificato in piastra.

L'aggiunta di IPA all'interno del terreno gli conferisce un aspetto lattescente/opaco, che facilita il riconoscimento delle colonie IPA degradanti, le quali vengono discriminate dalle altre in base alla comparsa di un alone di chiarificazione intorno alle colonie stesse.

Come controllo negativo. È stato preparato un terreno a un doppio strato con, al posto della soluzione di IPA, solo acetone.

Per ciascun IPA utilizzato, sono state allestite un numero di piastre, contenente terreno a doppio strato, in funzione del numero di ceppi batterici da testare (in media 5 ceppi batterici a piastra).

I consorzi microbici testati sono stati due: un consorzio specializzato, utilizzato in un precedente lavoro (90), e un altro isolato dai sedimenti marini portuali. Nella figura seguente sono riportati i singoli ceppi che costituiscono i due pool microbici

<b>Consorzio specializzato :</b>	<b>Consorzio endogeno :</b>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>Achromobacter spp.</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>Xanthomonas</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Staphylococcus succinus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
<i>Bacillus mojaviensis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Bacillus simplex</i>
<i>Arthrobacter misorens</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	<i>Bacillus aryabhatai</i>
	<i>Marinococcus spp.</i>

Ogni ceppo batterico, da esaminare, è stato seminato su piastre sterili Petri Ø 90 mm, contenenti terreno di coltura come il NUTRIENT AGAR (Oxoid™) e il MARINE AGAR (Oxoid™). Le piastre sono state, poi, incubate a  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$  per 3 giorni per permettere una crescita ottimale dei ceppi batterici.

In seguito, ogni ceppo è stato seminato nel terreno a doppio strato mediante tecnica della semina a “spot” per testare la sua abilità nel degradare il naftalene, fenantrene, pirene e benzo(a)pirene.

Le piastre di Petri sono state, poi, incubate a 22°C per 28 giorni, poiché i caratteristici aloni di chiarificazione compaiono intorno alla quarta settimana d’incubazione.

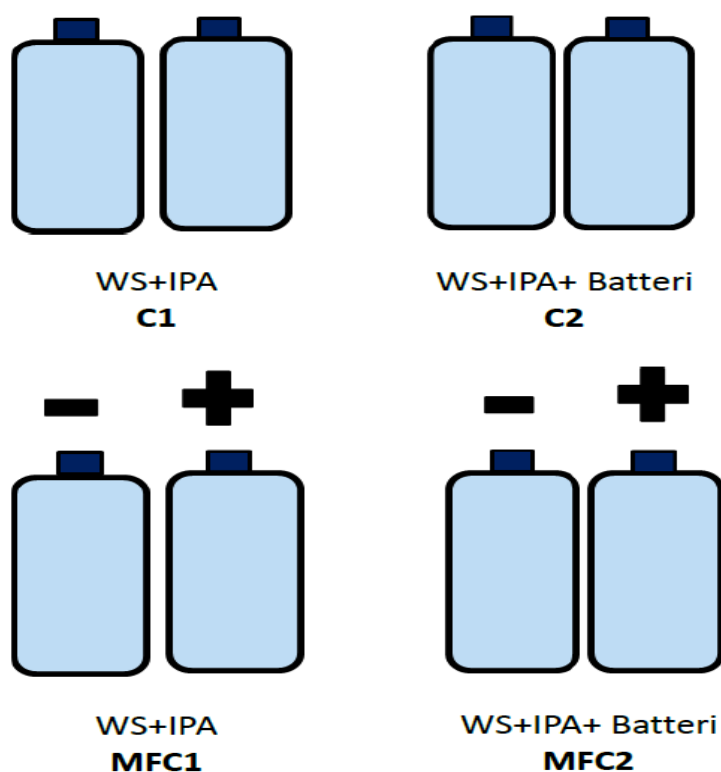
Ogni test è stato eseguito in duplice replica.

### **3.1.5. Allestimento sistema modello**

Nel corso dell’evoluzione i batteri hanno sviluppato grandi proprietà di adattamento alle diverse condizioni ambientali riuscendo a sfruttare, come fonte di carbonio e di energia, un numero vasto ed eterogeneo di composti chimici, convertendoli in intermedi del loro metabolismo centrale. Tra questi composti vi sono anche gli idrocarburi policiclici aromatici.

Per verificare l’efficacia delle Microbial Fuel Cells nel migliorare l’attività di un consorzio batterico nel degradare gli IPA e detossificare una matrice inquinata da IPA, è stato allestito un sistema modello di bioremediation ex-situ a matrice liquida, contaminata artificialmente, composto da due unità:

- Bioreattore
- Microbial Fuel Cell (MFC) a singola camera (single-chamber) con anodo immerso nella matrice acquosa (ambiente anossico) e il catodo immerso solo parzialmente con una parte, quindi, esposta all’ aria (air-cathode) in modo da poter utilizzare l’ossigeno come accettore finale degli elettroni.



Schema 2: sistema modello Obiettivo 1

Ogni unità è stata assemblata in duplice repliche e, tutto il sistema, è stato posto a temperatura di  $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Inoltre sia le MFCs che i bioreattori sono stati coperti per impedire fotodegradazione degli IPA.

Nel dettaglio, lo schema sperimentale prevede:

- Bioreattore: I bioreattori (C1 e C2) allestiti con bottiglie Pyrex, (500mL di volume)

Il bioreattore C2 è stato allestito con 400 mL di soluzione di Winogradsky (vedi paragrafo 3.1.4.), addizionata con la soluzione di IPA scelti disciolti in acetone (8mg/ml) e l'inoculo del consorzio batterico (in concentrazione di  $10^7$  a  $10^8$  UFC/mL). Invece il bioreattore C1 funge da controllo negativo, infatti è costituito da sola soluzione di Winogradsky, addizionata con la soluzione di IPA scelti.

Tutte le bottiglie sono costituite da un tappo con una singola apertura per il passaggio del tubo con ovatta che assicura una pressione barometrica costante.



Fig.3.1.5. 1: Bioreattore.

- Microbial Fuel Cell (MFC): Le MFCs (MFC1 e MFC2) sono state allestite con bottiglie Pyrex, (500mL di volume). MFC2 è composto da 400 mL di soluzione di Winogradsky (vedi paragrafo 3.1.4), addizionata con la soluzione di IPA scelti disciolti in acetone (8mg/ml) e l'inoculo del consorzio batterico (in concentrazione di  $10^7$  a  $10^8$  UFC/mL). MFC1, come controllo negativo, è costituito da la sola soluzione di Winogradsky, addizionata con la soluzione di IPA scelti.

Tutte le bottiglie presentano un tappo con tre piccole aperture per il passaggio di:

- un anodo, grafite e fibre di carbonio di dimensioni di  $21 \text{ cm}^2$
- un catodo, matite di grafite;
- un tubo con ovatta, per assicurare una pressione barometrica costante.



Fig.3.1.5. 2: MFC



Fig.3.1.5. 3: Anodo di grafite/fibre carbonio, catodo di grafite

Ogni elemento del sistema è stato assemblato in duplice repliche: Il sistema è stato posto a temperatura di  $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Inoltre sia le MFCs che i bioreattori sono stati coperti per impedire fotodegradazione degli IPA.

Il tempo di osservazione è stato all'incirca di due mesi.

Questo schema è stato impiegato sia per l'esperimento con il consorzio specializzato, sia per quello con il consorzio isolato da ambiente marino.

Preparazione delle soluzioni degli IPA e dell'inoculo batterico.

La soluzione IPA è stata preparata utilizzando tutti e quattro gli IPA alle seguenti concentrazioni:

- Naftalene 80 ppm;
- Fenantrene 40 ppm;
- Pirene: 40 ppm;
- Benzo(a)pirene 20 ppm.

Tutti gli IPA sono solubilizzati in acetone alla concentrazione di 8 mg/mL. Tale soluzione è stata preparata per rendere il più omogenea possibile la distribuzione degli IPA nella matrice utilizzata durante le analisi, in quanto questa classe di molecole è di natura fortemente idrofobica.

Per la preparazione dell'inoculo, i ceppi del consorzio sono stati seminati su piastre sterili Petri Ø 90 mm, contenenti terreno di coltura massimo NUTRIENT AGAR (Oxoid™) o MARINE AGAR (Oxoid™) in funzione del tipo di consorzio. Le piastre sono state incubate a 20°C per 5 giorni.

In seguito le colonie, per ogni ceppo, sono state prelevate dalla piastra e stemperate in soluzione di Winogradsky diluita (vedi paragrafo 3.1.4.), fino a raggiungere la concentrazione microbica di  $10^7/10^8$  UFC/mL (mediante lettura spettrofotometrica a 600 nm).

### 3.1.6. Analisi microbiologiche

Dopo un mese di trattamento, sono state eseguite analisi microbiologiche su campioni di MFC2 e C2 per poter valutare sia qualitativamente che quantitativamente la crescita del consorzio batterico nella matrice liquida. Inoltre sono stati analizzati microbiologicamente anche gli elettrodi di MFC2 per quantificare la concentrazione microbica del biofilm.

Per eseguire l'analisi sulla microflora planctonica, nei campioni MFC2 e C2, è stato seguito il seguente protocollo:

- Prelievo di 1 mL di campione dalle unità interessate e aggiunto a 9 mL di tampone fosfato Na-K (0,9%)
- Agitazione mediante Vortex
- Allestimento di diluizioni scalari utilizzando come diluente il tampone fosfato Na-K (0,9%)
- Semina in piastra su terreno di coltura massimo, NUTRIENT AGARV(Oxoid™) o MARINE AGAR (Oxoid™) (in funzione del consorzio analizzato), mediante la tecnica di spatolamento (semina di 100 µL di campione sul terreno agarizzato contenuto in piastre sterili Petri), e su terreni selettivi come Pseudomonas Agar Base (PAB), Mc Conckey Agar (MCA), Baird Parker Agar (BPA), Mannitol Egg Yolk Polymixine (MYP).

Le piastre Petri Ø 90 mm sono state incubate, in condizioni aerobiche, a 30°C per 2 giorni.

I risultati sono stati espressi come unità formanti colonie per millilitro (UFC/mL) di campione (ISO 7218:2007/Amd. 1:2013).

Per le analisi microbiologiche sul biofilm batterico, sono stati analizzati sia il catodo che l'anodo di MFC2, dopo un mese di trattamento, nel seguente modo:

- Prelievo di circa 1 cm<sup>2</sup> di biofilm dall' elettrodo, con un tampone di cotone sterile (VWR-PBI International)
- Risospensione del materiale raccolto in 2 ml di PBS + Tween 80 (concentrazione finale 0,1% v / v)

- Utilizzo del Vortex per 5 minuti
- Allestimento di diluizioni scalari utilizzando come diluente il tampone fosfato Na-K (0,9%)

Si procede come fatto per le analisi della microflora platonica (vedi protocollo precedente)

### **3.1.7. Monitoraggio performances della MFCs**

Per valutare la produzione di energia elettrica e, quindi, l'efficienza delle celle MFC1 e MFC2, sono stati monitorati, settimanalmente, i seguenti parametri:

- differenza di potenziale ( $\Delta V$ ): ogni particella carica è caratterizzata da un potenziale elettrico, la differenza di potenziale elettrico determina il moto delle cariche lungo il circuito tra anodo e catodo. La differenza di potenziale è espressa in mV;
- densità di corrente (CD), espressa in milliAmpère (mA), rappresenta la quantità di carica che attraversa una data superficie  $S$  o volume ( $\text{mA}/\text{m}^3$ ), all'interno del conduttore nell'unità di tempo;
- densità di potenza (PD), espressa in milliWatt, è la distribuzione della potenza su di una superficie o volume ( $\text{mW}/\text{m}^3$ ).

Il voltaggio (o tensione) nelle MFC viene espressa come differenza di potenziale tra l'anodo e il catodo.

La performance delle MFC è stata valutata sulla base del voltaggio e della corrente in uscita (cioè la corrente prodotta). La corrente elettrica ( $I$ ), che fluisce attraverso un circuito esterno, è stata stimata utilizzando la resistenza esterna impiegata ( $\Omega$ ) e i potenziali misurati ( $V$ ). L'andamento della corrente prodotta dalla cella, in funzione del voltaggio, viene rappresentato graficamente da una curva di polarizzazione (Fig.3.1.7. 1)



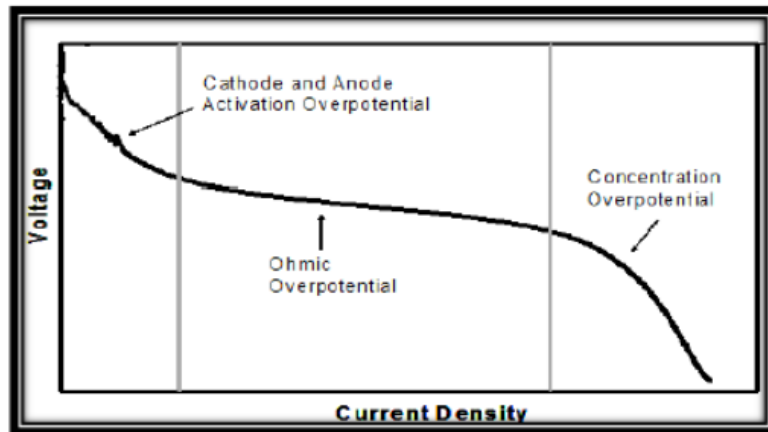


Fig.3.1.7. 1: Curva di polarizzazione usata per valutare la performance di una MFC

La curva di polarizzazione, per ogni MFC, è stata costruita settimanalmente, variando, dopo che la MFC ha raggiunto una stabilità di potenziale cellulare, la resistenza esterna, da un valore elevato (OCV) a un valore minimo dove si verifica  $I_{sc}$  (corrente di corto circuito), in tutto il circuito esterno a intervalli medi di circa 5 minuti e misurando il voltaggio della cella. Essa permette di trovare il punto di ottimo, cioè il miglior compromesso tra tensione e corrente erogata.

La corrente in questo caso viene misurata in modo indiretto ricavandola dalla legge di Ohm:

$$i = \frac{\Delta V}{R}$$

Dove, in un conduttore, l'intensità di corrente (a temperatura  $T$  costante) è direttamente proporzionale alla tensione applicata ai suoi capi e inversamente proporzionale alla resistenza del conduttore.

La densità di potenza(PD) ( $\text{mWm}^{-3}$ ) è stata calcolata come:

$$P = \frac{I \times E}{A}$$

dove  $I$  (mA) è la corrente,  $E$  (mV) è il voltaggio e  $A$  ( $m^3$ ) è la superficie dell'anodo.

Quindi, sia la densità di potenza ( $Wm^{-3}$ ) che la densità di corrente ( $Am^{-3}$ ) sono riferite al volume di “carburante” calcolate in accordo con le leggi di Ohm.

Inoltre, ponendo la densità di potenza in funzione dell'intensità di corrente, si ottiene la curva di potenza che permette di dedurre quanta potenza elettrica si può ottenere dalla MFC.

E' possibile, in aggiunta, calcolare l'efficienza columbica, integrando l'intensità di corrente nell'arco del tempo ( $t$ ).

L'efficienza columbica, definita come il rapporto tra la quantità di carica effettivamente trasferita all'elettrodo dal substrato e la quantità di carica che teoricamente sarebbe possibile ottenere dall'ossidazione completa del substrato. Nel caso in esame, dove si è in presenza di un substrato complesso, invece che la concentrazione del substrato, si utilizza la domanda chimica di ossigeno (COD).

La formula per il calcolo è la seguente:

$$\eta_C = \frac{M \int_0^t I dt}{F b v_{An} \Delta COD}$$

Dove:

$M$ : è la massa molecolare della specie accettatrice di elettroni;

$F$ : è la costante di faraday;

$b$ : è il numero di elettroni scambiati per mole;

$v_{An}$ : è il volume di liquido nel compartimento anodico;

$\Delta COD$ : è la differenza del valore di COD tra il tempo zero e il dopo un tempo  $t$ .

### **3.1.8. Analisi chimiche**

Al fine di determinare l'efficienza degradativa dei ceppi batterici testati, sono state condotte analisi chimiche dopo 5 e 11 settimane di trattamento sui campioni delle MFC (MFC1 e MFC2) e dei bioreattori (C1 e C2). Queste analisi sono rivolte alla determinazione dell'andamento della concentrazione degli IPA nel tempo e della domanda chimica d'ossigeno (COD) e del carbonio organico totale (TOC). Tale analisi sono state eseguite dal laboratorio ACE di Chimica analitica, diretta dal prof. Marco Trifuoggi, facente parte del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Napoli Federico II.

#### **3.1.8.1 Determinazione degli IPA**

Il metodo prevede la determinazione quantitativa degli idrocarburi policiclici aromatici mediante estrazione su fase solida (Metodo EPA 3535 A) e successiva quantificazione e determinazione in GC-MS (gascromatografia con spettrometro di massa) (Metodo EPA 8270 D).

L'identificazione dei singoli IPA e la loro quantificazione si basano sul confronto dei tempi di ritenzione dei picchi del cromatogramma, ottenuto dall'analisi dell'estratto del campione, con quelli ottenuti da idonee soluzioni standard di riferimento. La determinazione quantitativa degli IPA viene effettuata per interpolazione lineare delle aree dei rispettivi picchi cromatografici sulle curve di calibrazioni ottenute con soluzioni standard a concentrazione nota.

Tale metodo risulta essere abbastanza sensibile, in quanto ci consente di quantificare gli idrocarburi policiclici aromatici ad una concentrazione inferiore o uguale, a 0,005 µg/L.

E' possibile che alcuni IPA possano presentare lo stesso tempo di ritenzione, in questo caso, visto che il riconoscimento è basato solo sul tempo di ritenzione, si possono effettuare procedimenti di purificazione per ridurre al minimo queste interferenze.

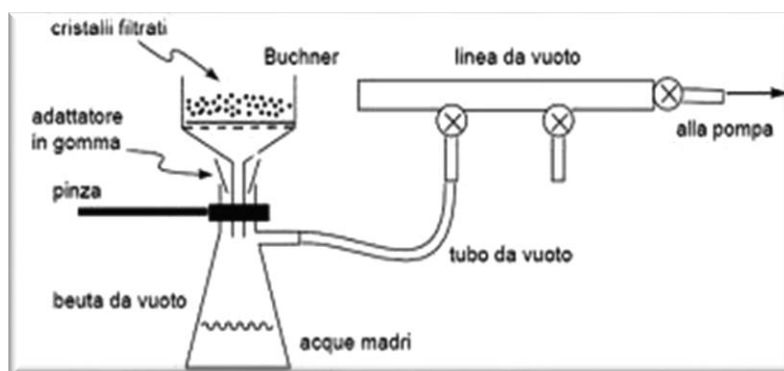
Solventi, reagenti, vetreria, contaminazione dell'ambiente di lavoro possono causare artefatti e, quindi, errori nell'interpretazione dei dati. Per tale motivo vengono utilizzate delle prove in bianco durante le analisi.

#### *Estrazione su fase solida di IPA*

Il metodo impiegato, EPA3535 A, è una procedura per isolare analiti organici da campioni acquosi usando mezzi di estrazione in fase solida (SPE). Questo metodo permette di estrarre una varietà di composti organici da matrici acquose (acqua sotterranea, acque reflue, ecc).

Gli analiti vengono estratti tramite estrazione su fase solida (SPE) utilizzando “*Empore disk C18*” (o cartuccia C18) più pre-filtro di carta per evitare che il disco C18 venga otturato. Il disco viene lavato e ambientato con 5 mL di acetato di etile e successivamente con 5 mL di metanolo sotto vuoto, dopodiché, si rimuove l'eccesso di solvente con acqua esente da contaminanti organici (10 mL di acqua distillata). Viene fatto filtrare un volume noto di campione (100 mL) con 5 mL di metanolo (al fine di sciogliere meglio il contenuto), attraverso il disco applicando un vuoto di 10 cm di Hg. Durante questa operazione è necessario prevenire che il disco vada a secco controllando il vuoto e chiudendolo al momento opportuno. Alla fine della filtrazione, si fa passare aria attraverso la membrana per alcuni minuti per rimuovere l'eccesso di acqua.

Gli analiti vengono eluiti, facendo passare acetato di etile (20 mL) con un vuoto moderato (circa 0,5 cm di Hg). Viene raccolto l'eluato in una provetta graduata e trasferito in un pallone.



Apparato di filtrazione

Si procede con l'evaporazione del solvente residuo immergendo il pallone in un bagnetto del *Rotovapor* (evaporatore rotante più vuoto) a 40°C e ad un velocità di rotazione di 90 rpm. Infine si recupera l'estratto con 100 µL di una miscela acetone/esano 1:1 (v/v).

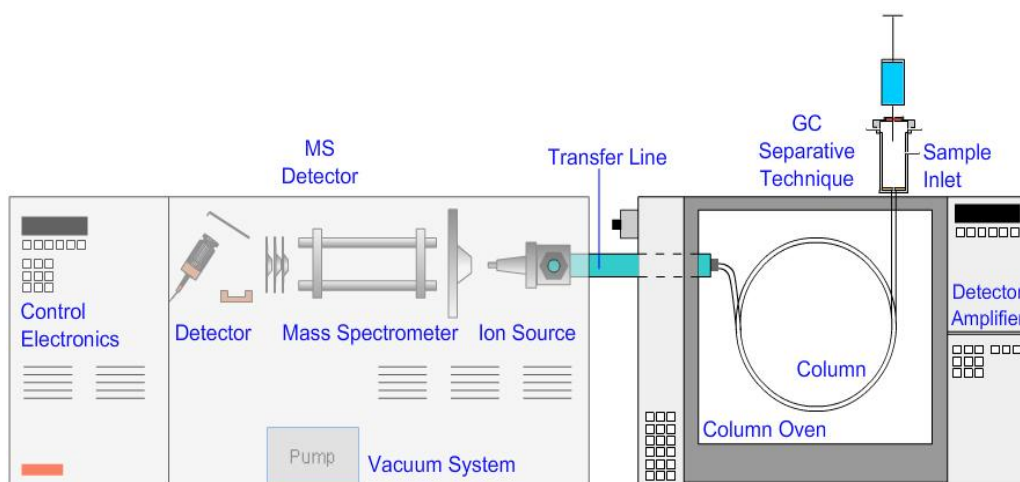
#### *Metodo analisi GC-MS*

La tecnica GC-MS (*Gas Chromatography - Mass Spectrometry*) è una tecnica analitica basata sull'utilizzo di un gascromatografo accoppiato a uno spettrometro di massa. La prima tecnica (GC) separa i componenti della miscela e produce composti isolati che vengono identificati dallo spettrometro di massa. Gli spettri ottenuti contengono una notevole quantità di informazioni, che sono, in genere, sufficienti per caratterizzare una specie incognita. L'abbinamento delle due tecniche fornisce, allo stesso tempo, informazioni di tipo qualitativo (tempi di ritenzione e spettri di massa) e quantitativo (abbondanza)

Un sistema gascromatografo schematicamente consta di:

- una bombola di gas carrier munita di riduttori di pressione ed eventuali filtri. Questi ultimi hanno il compito di purificare il gas in ingresso da eventuale vapore acqueo e impurità varie;
- un gascromatografo propriamente detto, con un ulteriore regolatore di flusso, un sistema di introduzione del campione, una o più colonne poste all'interno di un forno e uno o più detector;
- Uno spettrometro di massa consta delle seguenti parti:

- sorgente, che riceve il campione e ne ionizza le molecole
- analizzatore, che ha il compito di selezionare gli ioni (cationi e radical cationi) sulla base della loro massa
- detector (o analizzatore di ioni), costituito da un moltiplicatore di ioni .
- interfaccia che collega lo spettrometro a un software per la gestione, l'elaborazione e l'immagazzinamento dei dati.



Schema GC-MS

Nel lavoro di tesi, è stato utilizzato il modello GC-MS TQ8030 Shimadzu interfacciato a uno spettrometro di massa a quadrupolo a 70 eV, e la scansione da  $m/z$  40-600 (a 2,62 scansioni / s)(2). La fase mobile è un gas (*carrier*), elio, che fluisce attraverso una colonna capillare, DB-5MS in cui è posta la fase stazionaria, 5%-Poli fenil metil silossano con capillare lungo 30 m, con diametro 0,25 mm.

Infine, i dati possono essere acquisiti in due modalità: *Scan acquisition* e SIM. Mediante la modalità *Scan acquisition*

Una volta eseguita l'estrazione, si procede alla fase di quantificazione tramite GC-MS TQ8030 Shimadzu interfacciato a uno spettrometro di massa a quadrupolo. La temperatura dell'iniettore è stata impostata a 310 °C e le soluzioni sono state analizzate in modalità splitless. La programmata termica usata è quella riportata in tabella

Segmento	T iniziale (C)	T finale (C)	Gradiente (C/min)	Durata segmento (min)
1	50	100	20	2.50
2	100	300	5	40
3	300	300	0	2.50

Tabella 1: Programma termico utilizzato per l'analisi GC-MS

## Espressioni risultati

Dopo aver iniettato nel cromatografo volumi uguali di estratto e di soluzioni di riferimento diluite, vengono costruite le rette di taratura per i singoli IPA, accertandosi di operare nel campo di linearità dello strumento. La concentrazione incognita di ogni componente è data dalla relazione:

$$C = \frac{R_{IPA} \cdot M_{si} \cdot V_{camp}}{R_{si} \cdot RF \cdot V_{in} \cdot V_{acqua} \cdot Rec \cdot 10}$$

Dove:

C = concentrazione espressa in ng/L

RIPA = risposta dell'IPA misurata nel campione (abbondanza dello ione caratteristico)

Rsi = risposta dello standard interno misurata nel campione (abbondanza dello ione caratteristico)

Msi = massa di standard interno iniettata (pg)

RF = fattore di risposta per l'IPA

Vcamp = volume del campione prima dell'analisi (μL)

Vin = volume di campione iniettato (μL)

Vacqua = volume del campione d'acqua estratto (L)

Rec = recupero dell'IPA (%; nota 28)

Le iniezioni del campione e dei riferimenti interni vengono ripetute almeno due volte al fine di migliorare l'accuratezza delle misure sperimentali. Per verificare la ripetibilità della risposta strumentale si effettuano 10 iniezioni di una delle soluzioni di riferimento. Viene valutato il

recupero dei riferimenti interni effettuando cinque determinazioni su una matrice reale. Il recupero di ogni riferimento interno calcolato rispetto alla soluzione di lavoro deve essere maggiore del 50%. I campioni, i cui recuperi sono inferiori al 40% o maggiori del 120% vengono riestratti e rianalizzati.

### **3.1.8.2.Determinazione della domanda chimica di ossigeno (COD) e del carbonio organico totale (TOC)**

La determinazione del COD viene utilizzata per determinare la quantità di ossigeno richiesto per ossidare per via chimica le sostanze organiche presenti nel campione in esame. La determinazione del COD è stata effettuata sulla frazione liquida delle MFC e dei bioreattori, quindi la frazione solubile, in quanto è la sostanza organica solubile a essere direttamente disponibile per i microorganismi. In breve, i campioni sono stati centrifugati a 6000 g per 10 minuti a 5 ° C e il surnatante è stato filtrato attraverso un PTFE da 0,22 µm per rimuovere la biomassa sospesa. Sono stati utilizzati i kit LCK della HACH LANGE, che differiscono dal metodo classico soltanto per il volume di campione, pari a 2 mL; la quantificazione non avviene con il metodo titrimetrico bensì fotometrico alla lunghezza d'onda di 440 nm (APAT CNR IRSA 5130 Man 29 2003).

Invece la determinazione del TOC (Total Organic Carbon) è una misura della quantità di carbonio legato in un composto organico ed è spesso utilizzato come indicatore non-specifico della qualità delle acque o nell'analisi dei fumi risultanti dai processi di combustione come indice del livello di completezza della combustione stessa. Per la determinazione di questo parametro chimico, un'aliquota del campione (sia delle MFC che dei Bioreattori) in esame, opportunamente omogeneizzata e diluita, viene iniettata all'interno di una camera di reazione riscaldata ad alta temperatura (680°C), dove si trova un catalizzatore ossidativo a base di platino. Il campione di acqua viene vaporizzato e il carbonio totale viene ossidato a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. La CO<sub>2</sub> derivante dall'ossidazione del carbonio organico e/o inorganico viene trasportata



grazie ad un flusso di gas carrier e misurata da un analizzatore non dispersivo all'infrarosso (NDIR).

Il carbonio organico viene determinato per differenza del carbonio totale (TC) e carbonio inorganico secondo la relazione  $TOC = TC - IC$ . Un software fornisce la concentrazione del contenuto di carbonio organico totale (TOC) per il campione in esame tramite interpolazione lineare dell'area misurata, per il parametro TC e IC, sulla curva di taratura e il risultato è espresso in mg/L (Shimadzu, TOC-L CSN User's Manual, 2014).

### **3.1.9. Analisi ecotossicologiche**

Nel presente lavoro sono state effettuate analisi ecotossicologiche sui campioni delle celle microbiche (MFC1 e MFC2) e sul bioreattore con soluzione di Winogradsky e soluzione IPA(C1) e quella con l'aggiunta del consorzio batterico (C2).

Per determinare la tossicità su campioni il saggio scelto rappresenta quello maggiormente utilizzato nel campo ecotossicologico per la valutazione di campioni di matrice acquosa. L'organismo test è l'alga *Raphidocelis subcapitata* (test cronico) e l'endpoint indagato è l'inibizione della crescita algale(%) secondo il metodo ISO 8692:2012.

Le alghe rappresentano una componente fondamentale degli ecosistemi acquatici, infatti contribuiscono all'attività autopurificatrice dei corsi d'acqua, dei laghi e delle acque costiere e sono alla base dell'alimentazione degli organismi consumatori.

La modificazione della comunità fitoplanctonica causata da effetti tossici può alterare la struttura e il funzionamento di un intero ecosistema.

Quindi il saggio algale, eseguito con alghe verdi monocellulari, è un valido strumento d'indagine capace di fornire risposte utili nell'attività di monitoraggio ambientale.

Il principio di questo test riguarda lo studio dell'effetto tossico di una sostanza chimica sulle diverse generazioni di un clone algale. Il clone algale viene coltivato in un mezzo definito costituito da una serie di concentrazioni della matrice da analizzare alle quali sono state aggiunte opportune quantità di nutrienti. Le soluzioni da analizzare sono poste in incubazione per 72 ore al termine delle quali viene misurata la densità algale in ognuna di esse mediante lettura dell'assorbanza a 663 nm. L'inibizione è misurata come una riduzione del tasso di crescita specifico, rispetto alle colture di controllo coltivate in condizioni identiche.

Il materiale necessario per questo test è:

- organismo test , *Raphidocelis. subcapitata*
- acqua deionizzata , utilizzata per la preparazione dell'acqua di mare sintetica, del mezzo di crescita e della soluzione test
- nutrienti, quattro soluzioni madre, in acqua ultrapura, come indicato nella seguente tabella.

Nutrienti	Conc. nella soluzione madre	Conc. finale nel test
<i>sol. 1</i>	<i>g/L</i>	<i>mg/L</i>
NH <sub>4</sub> Cl	1,5	15
Mg Cl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,2	12
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,8	18
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,5	15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16	1,6
<i>sol. 2</i>	<i>mg/L</i>	<i>µg/L</i>
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	80	80
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	100	100
<i>sol. 3</i>	<i>mg/L</i>	<i>µg/L</i>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185	185
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	415	415
ZnCl <sub>2</sub>	3	3
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,5	1,5
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,01	0,01
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7	7
<i>sol. 4</i>	<i>g/L</i>	<i>mg/L</i>
NaHCO <sub>3</sub>	50	50

Tutti i nutrienti impiegati nella preparazione delle soluzioni madre devono essere di grado analitico. Le soluzioni 1; 2; 3; vengono autoclavate 15 minuti a 120°C ± 2°C, mentre la soluzione 4 viene filtrata (0,2 µm). Conservare le soluzioni a 4°C ± 1°C, al buio

L'apparecchiatura di riferimento è costituita da:

- Stanza a temperatura controllata, con luce bianca fluorescente che fornisce illuminazione continua,
- Apparecchio per la misura della densità delle cellule algale, preferibilmente un contatore di particelle o un microscopio con a camera di conteggio.
- Spettrofotometri
- Flask
- Apparecchi per filtrazione a membrana
- pHmetro

Le alghe sono state coltivate in mezzo di crescita ed incubate, opportunamente aerate, a 20 °C per 5 giorni in fluorescenza bianca continua fredda fino alla fase esponenziale della crescita. La crescita di popolazioni di alghe monocellulari, poste nel mezzo di coltura liquido segue, di norma, una cinetica di 1° ordine:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

dove:

X = parametro che indica la crescita algale

(biomassa, densità cellulare, ecc.);

$\mu$  = tasso specifico di crescita.

Il tasso specifico di crescita  $\mu$  è influenzato da importanti fattori quali la luce, la temperatura, la disponibilità dei nutrienti e del biossido di carbonio.

La sospensione algale risultante è stata aggiunta ad ogni campione (sospensioni MFC1, MFC2, C1 e C2) e al controllo (C0), costituito con un mezzo di coltura standard, raggiungendo una densità finale di  $10^3$  celle per litro. La densità iniziale delle cellule deve essere sufficientemente bassa per consentire una crescita esponenziale della coltura di controllo durante tutta la durata della prova. I test per i campioni vengono preparati mescolando, in volume appropriati, la soluzione del campione da testare, il mezzo di coltura standard e dell'inoculo algale, invece per il controllo si usa il mezzo di coltura standard e l'inoculo algale. I test vengono incubati a 20°C

sotto continua luce bianca per  $72 \pm 2$  h. Ogni test è stato eseguito in triplice replica. Le alghe sono state esposte a concentrazioni del campione in esame con relative diluzioni 0,1%, 1%, 2%. Le concentrazioni delle soluzioni di prova sono state definite in accordo con i risultati di uno screening preliminare. L'inibizione della crescita è stato espresso come percentuale di effetto, rispetto a C0, contenente solo il puro mezzo di coltura e le alghe. La presenza di differenza significativa in magnitudine di effetto tossico tra i campioni sono stati valutati con un'analisi di varianza (ANOVA), con livello di fiducia di  $r = 0,05$ .

Al termine delle 72 ore, la densità algale delle soluzioni viene determinata mediante lettura spettrofotometrica a 663 nm. Prima della lettura, lo strumento viene “azzerato” con la soluzione del controllo.

L'inibizione percentuale può essere calcolata nel modo seguente:

$$I\% = \frac{C - S}{C} \times 100$$

C = Abs o concentrazione del Controllo

S = Abs o concentrazione della diluizione di campione testata.

## **3.2.OBIETTIVO 2**

### **3.2.1. Sediments Microbial Fuel Cell (SMFC)**

Per l'esperimento di biorisanamento dei sedimenti marini, sono state allestite delle Sediments Microbial Fuel Cells (SMFCs), a singola camera, su sei campioni di sedimenti marini raccolti nel Golfo di Pozzuoli, in Campania (Italia), precisamente in un sito fortemente contaminato da un impianto metallurgico (ora smantellato) nell'area di Bagnoli. Come riportato da Trifuoggi et al. 2017, dalle analisi chimiche di questi campioni è stato riscontrato un forte inquinamento da IPA con la presenza di tutti i 16 IPA elencati tra gli "inquinanti prioritari" dall' US-EPA. Infatti questi campioni presentano un'elevata concentrazione di IPA, con concentrazioni che vanno da un massimo di 30 ppm (fluorantene) a un minimo 0,21 ppm (acenaftene).

I sei campioni di sedimenti marini provengono dal Golfo di Pozzuoli, nella Regione Campania (Italia), precisamente dall' area di Bagnoli, fortemente contaminata negli anni da un industria metallurgica ora dismessa. La zona costiera del sito industriale disabitato di Bagnoli è stata studiata dal 1999 per evidenziare le caratteristiche chimiche ed ecologiche dell'inquinamento dovuto ad un impianto di acciaiao. Studi effettuati in sedimenti marini campionati nella zona di Bagnoli hanno evidenziato che questa zona è fortemente contaminata da metalli e IPA (91,92). Inoltre, studi successivi, hanno mostrato l'origine sia naturale che antropica (dovuta all' inquinamento industriale) di questi contaminanti (93). La distribuzione dei campioni è stata progettata per avere un buon dettaglio dell'intera area di Bagnoli e la profondità del mare è stata misurata da un ecografo e varia tra i 10 ei 20 in mare fino a 100 m di profondità in mare aperto. La posizione delle stazioni è stata determinata dalla DGPS (Differential Global Positioning System) come riportato nella figura seguente.



Fig.3.2.1. 1: Posizione stazioni di campionamento, Area Bagnoli

I sedimenti sono stati prelevati in diverse aree e profondità, come mostrato nella Tabella seguente.

Campioni	Latitudine	Longitudine	Profondità (m)
<b>T4.1</b>	40° 48.774'N	14° 9.515'E	<b>7,7</b>
<b>T4.2</b>	40° 48.546'N	14° 9.294'E	<b>21.5</b>
<b>T4.5</b>	40° 48.115'N	14° 8.819'E	<b>98</b>
<b>T5.3</b>	40° 47.412'N	14° 9.015'E	<b>4.1</b>
<b>T6.1</b>	40° 48.323'N	14° 9.768'E	<b>5.2</b>
<b>T6.2</b>	40° 48.038'N	14° 9.352'E	<b>7.5</b>

Tabella 2: Coordinate delle stazioni di campionamento (90)

I campioni sono stati raccolti in sacchetti di plastica, avvolti in fogli di alluminio e inviati in laboratorio; lì, sono stati congelati a -20 ° C. I campioni sono stati inoculati in celle a combustibile microbica a singola camera (MFC sediment single-chamber) con catodo esposto all'aria (air-cathode) in duplice replica (Fig.3.2.1. 2).

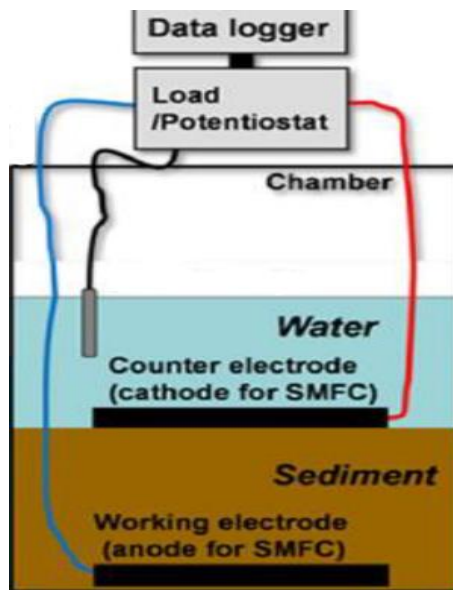


Fig.3.2.1. 2: Sediment Microbial Fuel Cell (SMFC)

Ogni SMFC è stata preparata utilizzando bottiglia PE (500 ml in volume) con 300 g di sedimento marino e 200 ml di acqua di mare, in duplice repliche. L'anodo è costituito da un foglio di carbonio (superficie di  $18 \text{ cm}^2$ ) e situato sotto 1 cm di sedimento. Per il catodo è stata impiegata una matita di grafite di 5 cm di lunghezza e di 0,6 cm di diametro ed è stato collocato nell'acqua a 2 cm sopra la superficie del sedimento. Il sistema è stato opportunamente areato per fornire un ambiente aerobico al catodo. L'insieme delle SMFC è stato incubato a  $21 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  e mantenuto al buio per evitare foto-ossidazione di IPA (6, 37).

Ogni cella è stata allestita in duplice replica

### 3.2.2. Identificazione molecolare da sedimenti marini

I sei campioni di sedimento, sia al tempo zero che dopo un mese di trattamento, sono stati analizzati per isolare ed identificare ceppi batterici potenzialmente IPA-degradanti.

A 10 g di campione di sedimento marino sono stati aggiunti 90 mL di soluzione fisiologica (0,9% p/v di NaCl), seguito da miscelazione meccanica per 2 minuti, attraverso uno omogeneizzatore a sbattimento (Stomacher® 400 circulator, Seward U.K.), in maniera tale da trasferire, in fase liquida, i batteri eventualmente adesi alla fase solida, da cui sono state

preparate le opportune diluizioni in base decimale scalari. Successivamente, e' stata effettuata la tecnica dell'inclusione su MARINE AGAR BASE(Oxoid™). Le piastre sono state incubate a 22°C per 72h. In seguito, sono state isolate le colonie predominanti mediante analisi morfologica. Per il metodo di estrazione del DNA e di amplificazione, sono stati eseguiti gli stessi del paragrafo 3.1.3

I campioni così preparati sono stati inviati all'azienda BioFab per purificazione e sequenziamento. I dati di sequenza ottenuti sono stati confrontati con quelli disponibili nel database di sequenza NCBI sono stati analizzati i campioni al tempo zero e dopo un mese di trattamento.

### **3.2.3. Analisi microbiologiche**

I campioni di sedimento al tempo zero e dopo un mese di trattamento, sono stati sottoposti ad analisi microbiologiche per valutare la composizione della comunità microbica. Inoltre sono stati analizzati anche gli elettrodi di ogni singola SMFC dopo un mese per la valutazione del biofilm batterico formatosi.

Per eseguire l'analisi, è stato seguito il seguente protocollo:

- Prelievo di 1 g di campione dalle unità interessate e aggiunto a 9 mL di tampone fosfato Na-K (0,9%)
- Agitazione mediante Vortex
- Allestimento di diluizioni scalari utilizzando come diluente il tampone fosfato Na-K (0,9%)
- Semina in piastra su terreno di coltura massimo, MARINE AGAR (Oxoid™), mediante la tecnica di spatolamento (semina di 100 µL di campione sul terreno agarizzato).

Le piastre sono state incubate, in condizioni aerobiche, a 30°C per 2 giorni.

I risultati sono stati espressi come unità formanti colonie per millilitro (UFC/g) di campione (ISO 7218:2007/Amd. 1:2013).



Per le analisi microbiologiche sul biofilm batterico, sono stati analizzati sia il catodo che l'anodo di ogni SMFC dopo un mese di trattamento, nel seguente modo:

- Prelievo di circa 1 cm<sup>2</sup> di biofilm dall' elettrodo, con un tampone di cotone sterile (VWR-PBI International)
- Risospensione del materiale raccolto in 2 ml di PBS + Tween 80 (concentrazione finale 0,1% v / v)
- Utilizzo del Vortex
- Allestimento di diluizioni scalari utilizzando come diluente il tampone fosfato Na-K (0,9%)
- Si procede come per le analisi del campione di sedimento (vedi protocollo precedente)

### 3.2.4. Monitoraggio delle SMFCs

La tensione è stata costantemente monitorata da un sistema ad ARDUINO (MEGA 2560) (Fig.3.2.4. 1), composto da una matrice di carico (per dati di acquisizione delle curve di polarizzazione) di sei resistenze che vanno da 1 M $\Omega$  a 100  $\Omega$ . Il software per l'acquisizione dei dati è stato sviluppato con pacchetti LabView Interface For Arduino (LIFA). I dati acquisiti sono stati utilizzati per elaborare, settimanalmente, le curve di polarizzazione per ogni MFCS.



Fig.3.2.4. 1: Arduino MEGA 2560

La densità di potenza (PD) e la densità di corrente (CD) sono stati riferiti alla superficie anodica e calcolati secondo la legge Ohm. Inoltre, ponendo la densità di potenza in funzione

dell'intensità di corrente, si ottiene la curva di potenza che permette di dedurre quanta potenza elettrica si può ottenere dalla MFC.

### **3.2.5. Analisi chimiche**

Al fine di determinare l'efficienza delle MFC nell'operare la degradazione degli IPA, sono state condotte analisi chimiche al tempo zero, dopo 14, 21 e 28 giorni di trattamento sui campioni delle 6 MFCS. Queste analisi sono rivolte alla determinazione dell'andamento della concentrazione dei 16 IPA prioritari nel tempo per valutare la loro degradazione. Tale analisi sono state eseguite presso il laboratorio del prof. Routh presso il Department of Thematic Studies - Environmental Change, Linkoping University(Sweden). Il metodo prevede (94,95):

- Pre-trattamento del campione con essiccamento a freddo
- Accelerated solvent extraction, un'estrazione dei componenti organici mediante l'uso di una miscela di solventi
- Evaporazione dei solventi per ottenere l'estratto lipidico totale (TLE)
- Estrazione in fase solida, con l'utilizzo di colonnine SPE, del TLE per isolare la frazione Neutra da quella Acida
- Separazione della Frazione Neutra (NF) in Alcani, IPA e Steroli mediante l'impiego di colonnie SPE Aminopropyl.
- Preparazione del campione per Analisi con GC-MS

La fase preliminare di essiccamento prevede una fase di congelamento nel freezer a -20°C per 2/3 h seguita da una fase di freeze-drying a -55°C, sotto vuoto, per permettere l'eliminazione dell'acqua dal campione con il minimo deterioramento possibile della struttura dei componenti presenti.

Successivamente, 5 g del campione pre-trattato, vengono sottoposti ad una fase di estrazione accelerata con solvente utilizzando una miscela di diclorometano:metanolo (9:1). Il metodo usato prevede 3 cicli a temperatura di 100°C.



Fig.3.2.5. 1: Estrattore accelerato

L'estratto ottenuto va incontro allo step di evaporazione del solvente, sotto pressione, in modo da concentrare e ridurre il volume dell'estratto lipidico totale (TLE), utilizzando Büchi Syncore SPE e, successivamente sottoposto a essiccamento sotto azoto. L'estratto lipidico totale (TLE) è stato successivamente separato in due frazioni, Frazione Neutra (NF) e Acida (FA), usando colonne di vetro da 6 ml confezionate con 500 mg di Supelco Superclean LC-NH-2 (1). Le colonne sono stati eluiti con  $\text{CHCl}_3$  / isopropanolo (2: 1 v / v , 15 mL frazione neutra) e acido acetico al 2% in etere dietetico (15 ml, frazione acida). La frazione neutra è stata ulteriormente sottoposta a separazione usando colonne cromatografiche di vetro da 6 mL per estrazione degli IPA da matrice solida (Interchim 1.5g/6ml-SPE-SA6) con esano e  $\text{CHCl}_3$ (1: 1 v / v, 5 ml) come eluenti, per ottenere così la frazione contenente gli IPA.

Per assicurare che la contaminazione non sia stata introdotta durante la fase di estrazione e / separazione delle frazioni lipidiche, sono stati allestiti dei bianchi seguendo lo stesso protocollo.

Sia per la fase di evaporazione che per le fasi di separazione, è stato utilizzato BüchiSycone cambiando semplicemente la parte superiore del macchinario.



Fig.3.2.5. 2: BüchiSycone

#### *Metodo analisi GC-MS*

La frazione ottenuta viene sottoposta ad essiccamento sotto azoto e risospesa in 1mL di esano. Dopo l'aggiunta di standard interni (androstando o crisene), necessari per la quantificazione, la frazione viene analizzata utilizzando come gascromatografo Agilent 6850N interfacciato a uno spettrometro di massa a quadrupolo Agilent 5975 a 70 eV, e la scansione da  $m/z$  40-600 (a 2,62 scansioni / s)(2).



Fig.3.2.5. 3: Gascromatografo Agilent 6850N

spettrometro di massa a quadrupolo Agilent 5975.

I campioni sono stati iniettati nel gascromatografo con modalità splitless (1  $\mu$ l; pressione di ingresso di 10 psi con un flusso velocità 54,3 ml / min) e separati su colonna capillare DB-5MS in cui è posta la fase stazionaria 5% fenile, 95% dimetil polisilossano. La fase stazionaria sotto forma di un film sottilissimo (0,25  $\mu$ m spessore) sulle pareti interne di un capillare silicio fuso (30 m lunghezza x 0,25 mm i.d). Le colonne sono alloggiare in una camera termostatica, in genere a circolazione di aria calda, con questo sistema viene assicurata una buona stabilità di temperatura. I campioni iniettai a flusso costante (1,3 ml / min) utilizzando l'elio come gas di trasporto con una portata costante di 1,3 mL/min

Il forno GC è stato avviato a 35°C tenuto per 1 minuto e aumentato fino a 130°C a 20°C/min, la temperatura è stata ulteriormente aumentata a 320°C a 6°C/min e mantenuto a temperatura per 15 min. Invece la temperatura dello spettrofotometro di massa è mantenuta a 150°C.

I dati sono stati acquisiti con le due modalità: Scan acquisition e SIM.

I composti sono stati identificati sulla base della loro massa caratteristica, tempo di ritenzione, frammentazione ioniche e l'ordine di eluizione utilizzando la libreria NIST MS (versione 2.0) e EPA 16 standard (16 IPA prioritari). Invece, per quantificare, sono stati utilizzati standard interni

(androstano, crisene) sulla base dei loro fattori di risposta. I limiti di rilevamento degli standard interni spaziano da 0,1 a 1 ng / mg e la riproducibilità del campione era  $\pm 10\%$ .

In colonna i campioni e i riferimenti interni vengono ripetute almeno due volte al fine di migliorare l'accuratezza delle misure sperimentali. Le curve di taratura sono state costruite iniettando, in contemporanea con la corsa in GC-MS dei campioni, anche uno standard contenente i 16 IPA prioritari. Espressioni dei risultati (vedi paragrafo 3.1.8.1)

### **3.2.6. Saggi ecotossicologici**

Nel presente lavoro sono state effettuate analisi ecotossicologiche sui campioni dei sedimenti marini al tempo zero e suoi campioni delle SMFCs dopo un mese di trattamento.

Per determinare la tossicità su campioni di matrice solida, il saggio scelto è il test cronico sull'alga *Phaeodactylum tricornutum* e l'endpoint indagato è l'inibizione della crescita algale(%) secondo il metodo ISO 10253:2016.

La scelta di questo metodo è dovuta non solo perchè previsto dalla normativa italiana per la valutazione della qualità dei sedimenti (DM 7 aprile 2008, D.lgs 260/2010), ma anche perchè, applicato alla matrice sedimento, dimostrando una buona sensibilità nella risposta (96)

Il principio di questo test riguarda lo studio dell'effetto tossico di una sostanza chimica sulle diverse generazioni di un clone algale. Il clone algale, in crescita esponenziale, viene coltivato in un mezzo definito costituito da una serie di concentrazioni della matrice da analizzare alle quali sono state aggiunte opportune quantità di nutrienti e acqua di mare sintetica. Le soluzioni d'analizzare sono poste in incubazione per 72 ore al termine delle quali viene misurata la densità algale in ognuna di esse mediante lettura dell'assorbanza a 670 nm. L'inibizione è misurata come una riduzione del tasso di crescita specifico, rispetto alle colture di controllo coltivate in condizioni identiche.

Il materiale necessario per questo test è:

- organismo test , *Phaeodactylum tricornutum*
- acqua deionizzata , utilizzata per la preparazione dell'acqua di mare sintetica, del mezzo di crescita e della soluzione test
- acqua di mare sintetica, preparata con i seguenti Sali (tabella) e filtrata con filtri da 0,45 µm.

Salt	Concentration of salt in synthetic sea water
	g/l
NaCl	22
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	9,7
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (anhydrous)	3,7
CaCl <sub>2</sub> (anhydrous)	1,0
KCl	0,65
NaHCO <sub>3</sub>	0,20
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,023

- nutrienti, 3 soluzioni stock preparate in acqua contenenti Sali e vitamine e sterilizzate con filtri da 0,22 µm.

L' apparecchiatura di riferimento è costituita da:

- Stanza a temperatura controllata, con luce bianca fluorescente che fornisce illuminazione continua,
- Apparecchio per la misura della densità delle cellule algali, preferibilmente un contatore di particelle o un microscopio con a camera di conteggio.
- Gli spettrofotometri
- Flask
- Apparecchi per filtrazione a membrana
- pHmetro

Le alghe sono state coltivate in mezzo di crescita costituito da acqua di mare sintetica e soluzione nutriente ed incubate, opportunamente aerate, a 20 °C per 5 giorni in fluorescenza bianca continua fredda fino alla fase esponenziale della crescita. La crescita di popolazioni di alghe monocellulari, poste nel mezzo di coltura liquido segue, di norma, una cinetica di 1° ordine.

Il tasso specifico di crescita  $\mu$  è influenzato da importanti fattori quali la luce, la temperatura, la disponibilità dei nutrienti e del biossido di carbonio.

La sospensione algale risultante è stata aggiunta ad ogni campione e al controllo (C0), costituito con un mezzo di coltura standard, raggiungendo una densità finale di  $10^3$  / $10^4$  cellule/mL. La densità iniziale delle cellule deve essere sufficientemente bassa per consentire una crescita esponenziale della coltura di controllo durante tutta la durata della prova. I test per i campioni vengono preparati mescolando, in volume appropriati, la soluzione del campione da testare, il mezzo di coltura standard e dell'inoculo algale, invece per il controllo si usa il mezzo di coltura standard e l'inoculo algale. I test vengono incubati a 20°C sotto continua luce bianca per  $72 \pm 2$  h. Le concentrazioni delle soluzioni di prova sono state definite in accordo con i risultati di uno screening preliminare. L'inibizione della crescita è stato espresso come percentuale di effetto, rispetto a C0, contenente solo il puro mezzo di coltura e le alghe. La presenza di differenza significativa in magnitudine di effetto tossico tra i campioni sono stati valutati con un'analisi di varianza (ANOVA), con livello di fiducia di  $r = 0,05$ .

Al termine delle 72 ore, la densità algale delle soluzioni viene determinata mediante lettura spettrofotometrica a 663 nm. Prima della lettura, lo strumento viene “azzerato” con la soluzione del controllo.

I valori di densità algale sono stati utilizzati per la determinazione della curva di crescita e per il calcolo del tasso di crescita ( $\mu$ ), utilizzando l'equazione

$$\mu = \frac{\ln N_f - \ln N_0}{T_f}$$

dove:

$T_f$  = tempo, in giorni, trascorso tra l'ultima misurazione e l'inizio della prova

$N_0$  = concentrazione di cellule nominale iniziale

$N_f$  = concentrazione di cellule misurata al tempo  $f$



Calcolati i valori medi di  $\mu$  per ciascuna concentrazione di prova e per la soluzione di controllo, da questi valori si è potuto ricavare la percentuale di inibizione del tasso di crescita di ciascuna concentrazione di prova rispetto al controllo, basandosi sull'equazione

$$I_{\mu_i} = \frac{\overline{\mu_c} - \overline{\mu_i}}{\overline{\mu_c}} \times 100$$

Dove:

$I_{\mu_i}$  = percentuale di inibizione del tasso di crescita per la concentrazione di prova  $i$

$\mu_i$  = tasso medio di crescita per la concentrazione di prova  $i$

$\mu_c$  = tasso medio di crescita per la soluzione di controllo  $i$

## 4. RISULTATI e DISCUSSIONI

### 4.1. OBIETTIVO 1

#### 4.1.1. Identificazione molecolare e Test in vitro di degradazione

Dai campioni di pulviscolo, prelevati presso la galleria Vittoria, e dai campioni di sedimenti marini portuali sono stati isolati i seguenti ceppi batterici, identificati mediante analisi biomolecolare (analisi del rDNA16S). Come si evince dalla Tabella il consorzio specializzato risulta essere composto da diverse specie batteriche invece, quello endogeno, da batteri appartenenti principalmente alla famiglie delle *Pseudomonadaceae*, *Bacillaceae*

##### Consortio specializzato :

*Alcaligenes faecalis*  
*Achromobacter spp.*  
*Xanthomonas*  
*Staphylococcus succinus*  
*Bacillus mojavensis*  
*Enterobacter aerogenes*  
*Arthrobacter misorens*  
*Pseudomonas anguilliseptica*

##### Consortio endogeno :

*Pseudomonas stutzeri*  
*Bacillus megaterium*  
*Bacillus cereus*  
*Bacillus pumilus*  
*Pseudomonas fluorescens*  
*Bacillus simplex*  
*Acinetobacter johnsonii*  
*Bacillus aryabhattai*  
*Marinococcus spp.*

Per valutare la capacità dei singoli ceppi batterici, che costituiscono i consorzi presi in esame, nell'usare gli IPA come unica fonte di carbonio ed energia, sono state eseguite delle semine "a spot", per ogni ceppo, su Mineral Salt Medium (MSM) a doppio strato con ciascun degli IPA scelti. Per cinque settimane, è stata monitorata la crescita batterica e l'eventuale formazione di aloni di chiarificazione (Fig.4.1.1. 1). Come controllo i ceppi batterici sono stati seminati su terreno a doppio strato contenente solo acetone.

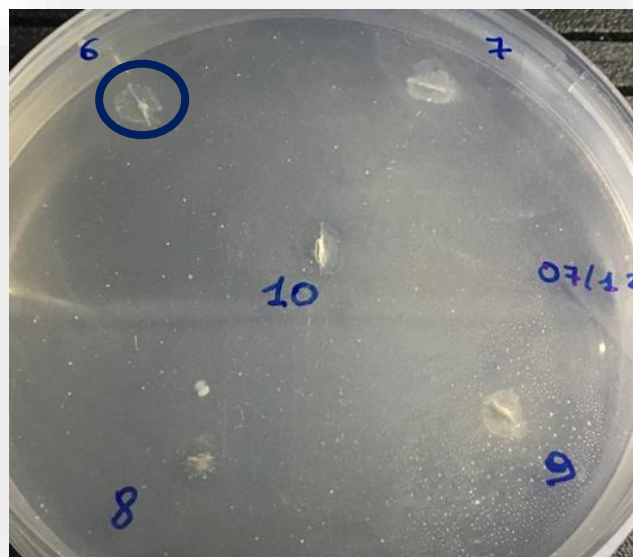


Fig.4.1.1. 1: Test di degradazione in vitro con benzo(a)pirene, colonie batteriche circondate da alone di degradazione.

In riguardo al consorzio specializzato; i risultati ottenuti mostrano la capacità degradativa dei batteri del consorzio su naftalene, fenantrene, pirene e benzo(a)pirene, evidenziata dalla comparsa di aloni di chiarificazione intorno alle colonie di ogni singolo ceppo batterico, come si evince dalla tabella 3. Non è stata evidenziata alcuna crescita sui terreni contenente solo acetone.

Ceppi batterici	Naftalene	Fenantrene	Pirene	Benzo(a)pirene	Acetone
<i>Alcaligenes faecalis</i>	C	C	C	A	N
<i>Achromobacter</i> spp.	C	C	C	A	N
<i>Xanthomonas</i> spp.	C	A	C	A	N
<i>S. succisus</i>	A	C	C	A	N
<i>B. mojavensis</i>	C	C	C	A	N
<i>E. aerogenes</i>	C	A	C	A	N
<i>A. misorens</i>	A	A	C	A	N
<i>P. anguilliseptica</i>	A	A	C	A	N

Tabella 3. Test di degradazione in vitro (A. alone di chiarificazione, C. crescita, N. nessuna

Per il consorzio endogeno, la capacità di degradare i 4 IPA utilizzati è stata riscontrata in tutti i ceppi batterici, evidenziata dalla comparsa di aloni di chiarificazione intorno alle colonie di ogni singolo ceppo batterico. Non è stata evidenziata alcuna crescita sui terreni contenente solo acetone.

Quindi tutti i ceppi microbici, di entrambi i consorzi, potrebbero utilizzare gli IPA selezionati come sola fonte di carbonio e di energia come dimostrato dalla loro crescita.

#### 4.1.2. Composizione della comunità microbica

Le analisi microbiologiche sono state condotte sul bioreattore(C2) e sulla MFC contenente il consorzio batterico (MFC2) dopo un mese di trattamento (tabella 4). Inoltre, nella cella a combustibile microbica, è stato analizzato il biofilm formatosi al livello degli elettrodi.

consorzio specializzato			consorzio endogeno		
BATTERI	C2	MFC2	BATTERI	C2	MFC2
<i>Alcaligenes faecalis</i>	$1,4 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	$1,3 \times 10^6$	-
<i>Achromobacter spp.</i>	$6,2 \times 10^6$	$5,1 \times 10^6$	<i>Bacillus megaterium</i>	$5,4 \times 10^5$	$4,8 \times 10^5$
<i>Xanthomonas</i>	$1,6 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	<i>Bacillus cereus</i>	$3,2 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$
<i>Staphylococcus succinus</i>	$4,1 \times 10^5$	$6,3 \times 10^5$	<i>Bacillus pumilus</i>	$4,5 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$
<i>Bacillus mojavensis</i>	$6,4 \times 10^5$	$8,5 \times 10^5$	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	$1,3 \times 10^6$	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	$1,1 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	<i>Bacillus simplex</i>	$5,4 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$
<i>Arthrobacter misorens</i>	$3,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	$1,4 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
<i>Pseudomonas anquilliseptica</i>	$1,4 \times 10^6$	-	<i>Bacillus aryabhatai</i>	$1,2 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$
			<i>Marinococcus spp.</i>	$1,4 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$

Tabella 4. Concentrazione batterica a 22°C in C2 e MFC2 (UFC/mL) dopo 1 mese di trattamento. I risultati sono espressi come valore medio,  $\pm$  E.S.

Dalle analisi si evince che, dopo un mese di trattamento, in entrambi i sistemi, è stata rilevata la presenza di tutte le specie batteriche del consorzio impiegato con una diminuzione della concentrazione, rispetto alla quella iniziale ( $10^7$  UFC/mL), di uno/ due unità esponenziali.

La particolarità è la scomparsa, nella fase liquida, delle specie di *Pseudomonas* in MFC2 per tutti e due gli esperimenti.

I risultati delle analisi eseguite sui biofilm, presenti su catodo e anodo, dopo un mese di trattamento, hanno mostrato la presenza delle specie di *Pseudomonas* sugli elettrodi in concentrazione intorno a  $10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> con una densità microbica maggiore al catodo.

Inoltre, per la *Pseudomonas anguilliseptica*, del consorzio specializzato, è stata osservata la produzione di Fenazine una volta inserita nella MFC



Fig.4.1.2. 1: Piastre di *Pseudomonas anguilliseptica* su Pseudomonas Agar Base

#### 4.1.3.Performance delle MFCs

La performance di ciascuna cella a combustibile microbiche è stata valutata nel corso del trattamento in base alla densità di potenza(PD), di corrente (CD) e l'efficienza columbica (CE).

Nell' esperimento con il consorzio specializzato, l'elaborazione delle curve di polarizzazione (Fig.4.1.3. 1 b) e d)), ha evidenziato, sia per MFC1 sia per la cella con consorzio batterico (MFC2), una fase di ritardo nel partire della durata di circa 3 settimane. Ciò può essere attribuito, nel caso di MFC2, alla mancanza di substrati facilmente biodegradabili da utilizzare, come fonte di elettroni, dai batteri. Invece, per MFC1, il ritardo è dovuto al non funzionamento della cella, ciò si evince dal fatto che ha dato solo due curve di polarizzazione.

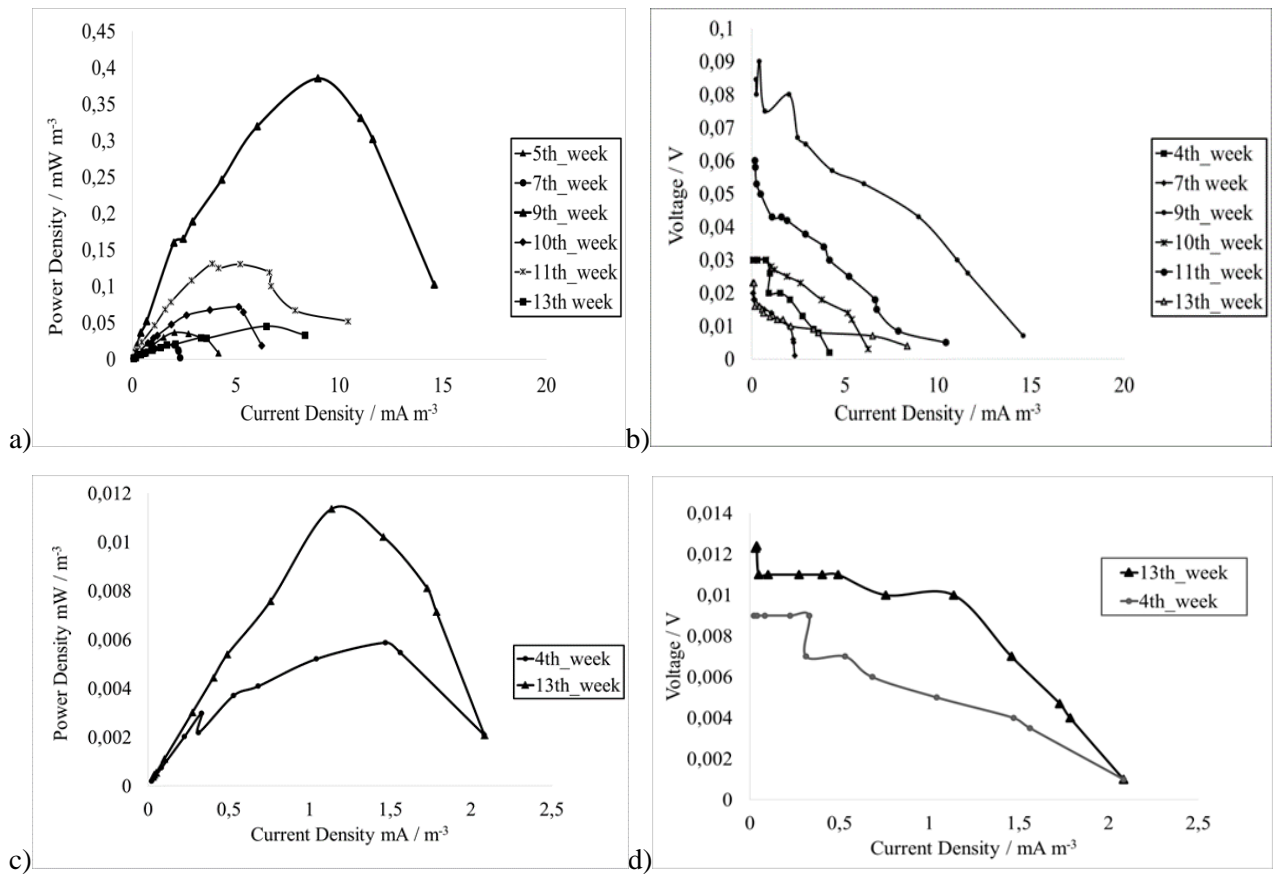
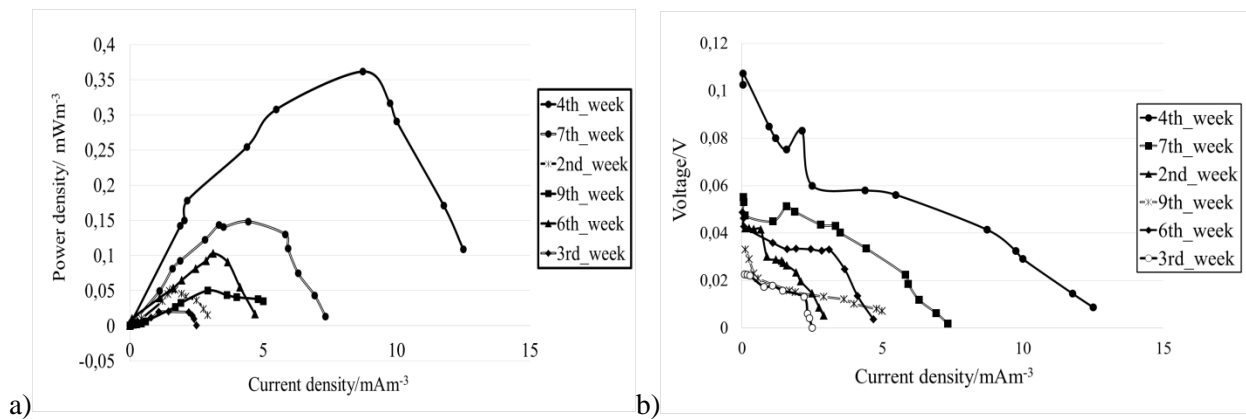


Fig.4.1.3. 1: Esperimento consorzio specializzato: Curve di potenza a) e di polarizzazione b) MFC2; Curve di potenza c) e di polarizzazione d) MFC1

Discorso analogo per l'esperimento con consorzio endogeno, dove la cella MFC1 presenta una fase di ritardo nel partire di 3 settimane circa, come è possibile osservare dalle curve di polarizzazione e potenza (Fig.4.1.3. 2 c) e d)). Invece MFC2, in questo esperimento, presenta una fase di ritardo della durata di 1 settimana circa.



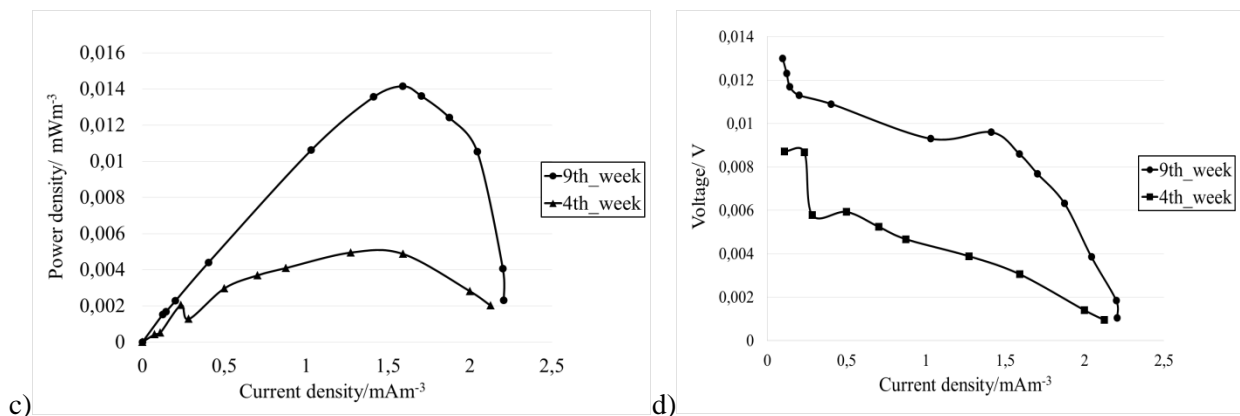


Fig.4.1.3. 2: Esperimento consorzio endogeno: Curve di potenza a) e di polarizzazione b) MFC2; Curve di potenza c) e di polarizzazione d) MFC1

Dall'osservazione delle curve di potenza di MFC2 (Fig.4.3.1. 1 a)), con consorzio specializzato, è possibile riscontrare che la cella ha raggiunto un massimo di PD e CD, dopo 9 settimane di funzionamento, con  $0,38 \text{ mW/m}^3$ ,  $15 \text{ mA/m}^3$ , e un CE del 4,2%. Inoltre è interessante notare che suddette curve mostrano un andamento quasi ciclico: la potenza raggiunta alla 7<sup>a</sup> settimana diminuisce rispetto a quella raggiunta alla 5<sup>a</sup> settimana, per poi risalire alla 9<sup>a</sup> settimana e per diminuire alla 10<sup>a</sup> settimana; infine aumenta leggermente all' 11<sup>a</sup> settimana per diminuire poi alla 13<sup>a</sup>. Una possibile spiegazione potrebbe essere il consumo di differenti fonti di elettroni (IPA e / o intermedi di degradazione) in tempi diversi (97). Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per fornire una corretta spiegazione a questo comportamento elettrico.

Invece MFC1 non ha un vero comportamento di polarizzazione (Fig.4.3.1. 1 c) e d)), come MFC2, infatti non è stata registrata una produzione di potenza significativa. Questo potrebbe esser dovuto alla bassa solubilità degli IPA in acqua che potrebbe impedire un'interazione significativa tra gli IPA e gli elettrodi (in assenza di batteri), nelle condizioni ambientali in cui era posta la MFC1 durante il trattamento. Tuttavia, è stata riscontrata una debole polarizzazione nella 4<sup>a</sup> settimana e 13<sup>a</sup>, con un massimo PD di  $0,011 \text{ mW/m}^3$ , un CD di  $2 \text{ mA/m}^3$ , gli IPA mostrano capacità di partecipare a reazioni elettrolitiche (98), e un CE dell'1,2%.

Per l'esperimento con consorzio endogeno, si evince, dalla comparazione delle curve di potenza (Fig.4.3.1. 2 a)) di MFC2, durante due mesi di trattamento, che la cella ha raggiunto il massimo PD e CD dopo 4 settimane di funzionamento, con  $0,36 \text{ mW/m}^3$ ,  $12 \text{ mA/m}^3$ . Però dopo due mesi di trattamento la cella ha smesso di funzionare. Anche in questo esperimento, le curve di potenza della MFC2 presentano un andamento ciclico: la potenza alla 3<sup>a</sup> settimana diminuisce rispetto a quella raggiunta alla 2<sup>a</sup> settimana, per poi risalire alla 4<sup>a</sup> settimana e per diminuire notevolmente alla 6<sup>a</sup> settimana; infine aumenta all' 9<sup>a</sup> settimana per poi diminuire alla 13<sup>a</sup>.

Ugualmente all'esperimento con consorzio specializzato, la cella MFC1 non presenta un vero comportamento di polarizzazione, come si osserva nella Fig.4.3.1. 2. c) e d) rispetto a MFC2. Di conseguenza non è stata prodotta una potenza significativa. Infatti è stata registrata una debole polarizzazione dopo 9 settimane raggiungendo il valore di  $0,014 \text{ mW/m}^3$  come massimo di potenza(PD), di  $2,2 \text{ mA/m}^3$  come massimo di corrente (CD). Dopo la 9 settimana le celle hanno smesso di funzionare con un CE pari a 0,9%.

#### **4.1.4. Analisi chimiche**

I risultati delle analisi chimiche; condotte sul controllo (C1), sul bioreattore (C2), sulla MFC con soluzione di Winogradsky e IPA (MFC1) e su quella con l'aggiunta del consorzio microbico(MFC2), sono stati ottenuti mediante analisi con GC-MS. Nello specifico, oltre a valutare l'andamento della concentrazione totale degli IPA, durante di due mesi trattamento, è stata valutata anche l'efficienza di rimozione, in termini percentuali, dei singoli IPA impiegati nell' esperimento.

#### **Esperimento consorzio specializzato**

I dati ottenuti su campioni di C1, C2, MFC1 e MFC2, dopo 5 settimane di trattamento, hanno mostrato una significativa diminuzione, quindi un ottimo grado di degradazione, in MFC2, di tutti gli IPA utilizzati, nel dettaglio:



- Il naftalene , partendo da una concentrazione di 80ppm iniziale, è passato a 2,3 ppm
  - Il frenantrene è passato da una concentrazione iniziale all' incirca di 40 ppm a 0,3 ppm
  - Il pirene, anche, ha subito una significativa riduzione di concentrazione, passando da una concentrazione di 40 ppm a 0,5 ppm (pirene)
  - Il benzo(a)pirene è andato incontro ad una notevole degradazione, tenendo conto della complessità della molecola, Infatti dalla concentrazione iniziale di 20 ppm è passato a 0,2 ppm
- Nel grafico, vengono riportati i valori delle concentrazioni totale degli IPA in entrambe le MFC, nel bioreattore (C2) e nel controllo (C1) dopo 5 e 11 settimane

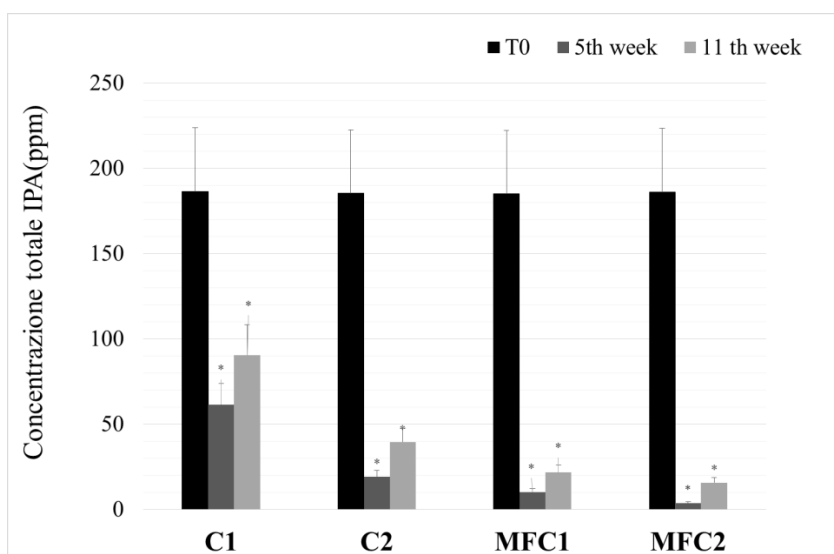


Fig.4.1.4. 1: Concentrazione totale IPA (ppm). \* indica una differenza significativa ( $p < 0,05$ ) nei test Fisher e Bartlett tra MFC2 e MFC1, C2 e C1 rispettivamente.

Dal grafico si evince che la concentrazione degli IPA è più bassa in MFC2 rispetto ai campioni di MFC1, C1 e C2. La concentrazione totale degli IPA in MFC2 e MFC1 è stata confrontata per poter valutare l'influenza dei fattori abiotici (es. scarsa solubilità degli IPA) sul processo di degradazione degli IPA, per comprendere l'efficacia al netto dei batteri nel degradare tali composti. Invece, per valutare l'effetto della elettrogenesi sul processo di degradazione degli IPA, le concentrazioni in MFC2 sono state correlate a quelle in C2 in cui opera lo stesso consorzio batterico ma in assenza di elettrodi.

Anche se il test Student non ha mostrato differenze significative tra MFC2 e gli altri campioni a ( $p$  valori erano  $> 0,05$ ), i test F Fisher e Bartlett hanno mostrato  $p$  valori  $< 0,05$  indice di una differenza significativa tra i gruppi di dati. Quindi i valori in MFC2 sono statisticamente diversi ( $\sigma = 0,05$ ) da quelli degli altri gruppi.

Invece, nella Fig.4.1.4. 2. viene posto a confronto l'efficienza di rimozione (%), dei singoli IPA utilizzati, di MFC2 con quella di C2, MFC1 e C1. In questo modo è possibile tener conto del peso dei fattori sia abiotici (es. solubilità limitata, adsorbimento sugli elettrodi, adsorbimento sulle pareti) che biotici (es. degradazione microbica, adsorbimento del biofilm batterico) sulla degradazione dei singoli IPA.

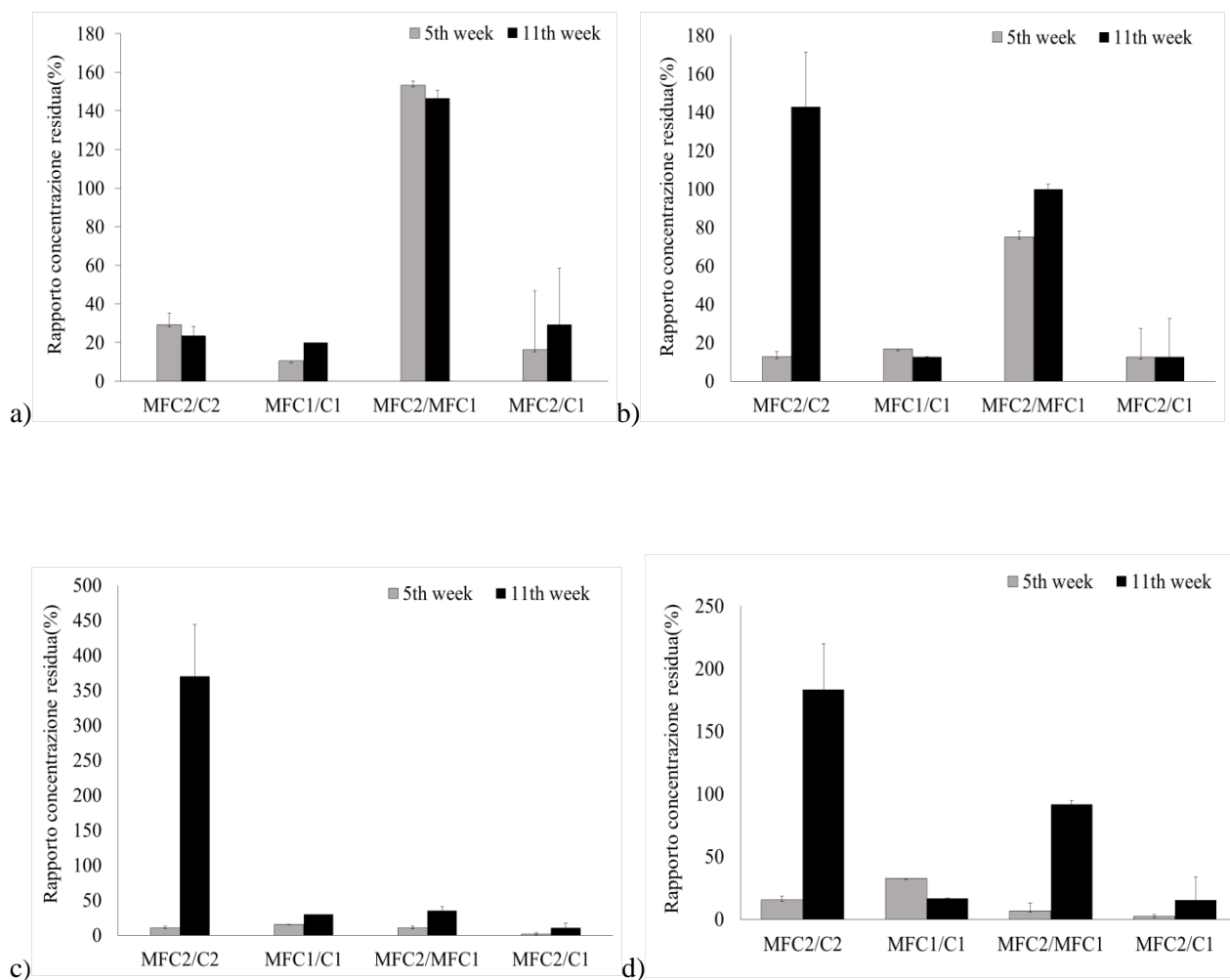


Fig.4.1.4. 2: Confronto tra le concentrazioni residue in MFC2 e in MFC1, C1 e C2.  
a) naftalene; b) fenantrene; c) pirene; d) benzo(a)pirene.

Per gli IPA più complessi è stata osservata un'efficacia di rimozione dell'89,4% per pirene e del 93,3% per benzo(a)pirene in MFC2 rispetto a MFC1. Inoltre un'efficienza di rimozione quasi del 100% di tali IPA rispetto a C1. La concentrazione di naftalene, invece, è aumentata in MFC2 rispetto a MFC1 probabilmente a causa della degradazione degli IPA più complessi. Inoltre, dopo 11 settimane, le concentrazioni di benzo (a) pirene, pirene e fenantrene sono più alte in MFC2 rispetto ai campioni MFC1 e C1. Questo potrebbe essere spiegato con una maggiore solubilità degli IPA a causa di tensioattivi, prodotti dai batteri, che porta ad un aumento della solubilità di tali composti. Ma anche nel confronto con C2 si evince un aumento degli IPA sopra citati (dove lo stesso consorzio microbico era presente), ciò potrebbe essere dovuto al rilascio di IPA dal biofilm batterico, che si forma sugli elettrodi (99). I batteri, infatti, possono conservare gli IPA e rilasciarli nel momento in cui hanno necessità di energia (99).

Data la complessità degli IPA, la loro diversa capacità di interagire con la grafite e la complessa interazione con i batteri nel biofilm, è necessario uno studio dedicato e approfondito per far chiarire questi risultati.

La presenza dell'antracene, anche se non incluso nel mix degli IPA di partenza, è stata rilevata dopo 5 settimane di trattamento a una concentrazione di 0,3 ppm; molto probabilmente formata dal degrado del benzo(a) pirene. Però, dopo 11 settimane di trattamento, la presenza di questo IPA non è rilevata.

Per quanto riguarda le analisi condotte per la valutazione del TOC e COD durante il trattamento, i risultati sono riportati nella tabella seguente.

<b>Campione</b>	<b>Abbattimento TOC (%)</b>	<b>Abbattimento COD (%)</b>
<b>C1</b>	0	0
<b>C2</b>	30,0	18,3
<b>MFC1</b>	37,1	20,4
<b>MFC2</b>	73,4	62,3

Tabella 5. Percentuale di abbattimento del TOC e COD (mg/L) per i campioni MFC1, MFC2, C1 e C2 dopo le 5 settimane di

Il COD è diminuito del 62% in MFC2, 20% in MFC1 e 18% in C2. Per il TOC, è stata osservata una rimozione del 73% in MFC2, del 37% in MFC1 e appena del 30% in C2 dopo 5 settimane di trattamento. Non è stata misurata la diminuzione di TOC e COD in C1, come previsto.

### Esperimento consorzio endogeno

Nel grafico seguente sono riportati i dati relativi alla concentrazione totale degli IPA nei 4 campioni (C1, C2, MFC1 e MFC2) al tempo zero, dopo 4 e 9 settimane di trattamento.

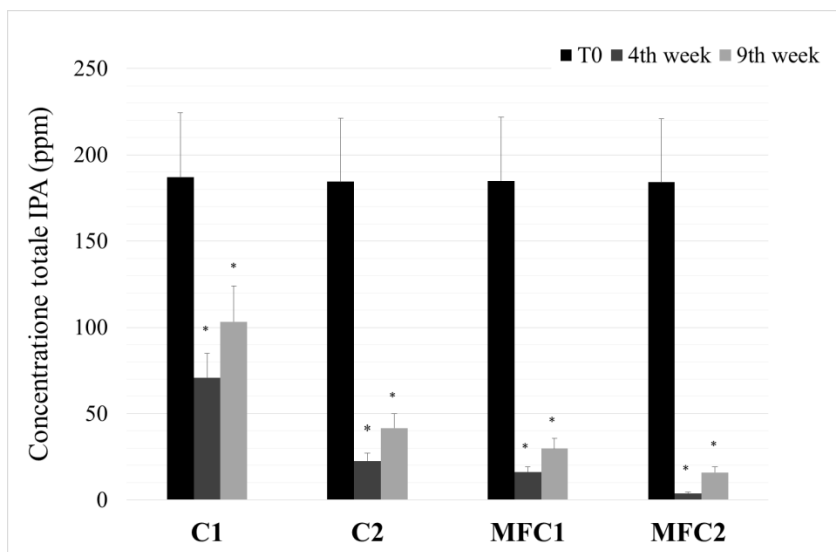


Fig.4.1.4. 3: Concentrazione totale PAHs (ppm). \* indica una differenza significativa ( $p < 0,05$ ) nei test F Fisher e Bartlett tra MFC2 e MFC1, C2 e C1 rispettivamente.

Come si evince dal grafico, la concentrazione degli IPA, rispetto al tempo zero, è più bassa in MFC2 che nei campioni di MFC1, C1 e C2. Quindi, dopo 4 settimana di trattamento, è stata osservata una significativa diminuzione della concentrazione totale degli IPA utilizzati, con un ottimo grado di degradazione, in MFC2:

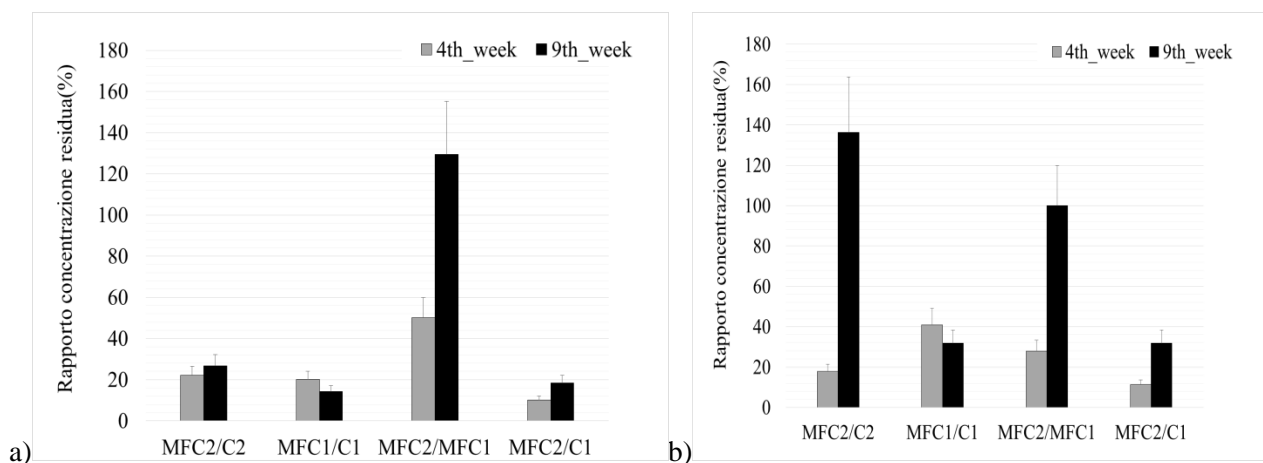
- Il naftalene, partendo da una concentrazione di 80ppm iniziale, è passato a 2,4 ppm
- Il fenantrene è passato da una concentrazione iniziale all'incirca di 40 ppm a 0,5 ppm
- Il pirene, anche, ha subito una significativa riduzione di concentrazione, passando da una concentrazione di 40 ppm a 0,7 ppm (pirene)

- Il benzo(a)pirene è andato incontro ad una notevole degradazione, tenendo conto della complessità della molecola, Infatti dalla concentrazione iniziale di 20 ppm è passato a 0,3 ppm

Dal punto di vista statistico, la concentrazione degli IPA in MFC2 e MFC1 sono state poste a confronto per poter valutare l'influenza dei fattori abiotici (es. scarsa solubilità degli IPA) sul processo di degradazione degli IPA. Invece, ponendo in confronto le concentrazioni degli IPA in MFC2 con quelle nel bioreattore (C2), si può valutare l'effetto della elettrogenesi sul processo di degradazione degli IPA, in quanto in C2 opera lo stesso consorzio batterico, presente in MFC2, in assenza, però, di elettrodi.

I test statistici applicati sono stati il test Student, che non ha mostrato differenze significative tra MFC2 e gli altri campioni (p valori erano  $> 0,05$ ), i test Fisher e Bartlett che, invece, hanno mostrato p valori  $< 0,05$  indice questo di una differenza significativa tra i gruppi di dati. Da ciò si può dedurre che i valori in MFC2 sono statisticamente diversi ( $\sigma = 0,05$ ) da quelli degli altri gruppi.

L'efficienza di rimozione (%), dei singoli IPA utilizzati, in MFC2 è stata confrontata con quella di C2, MFC1 e C1, come riportato dai grafici seguenti:



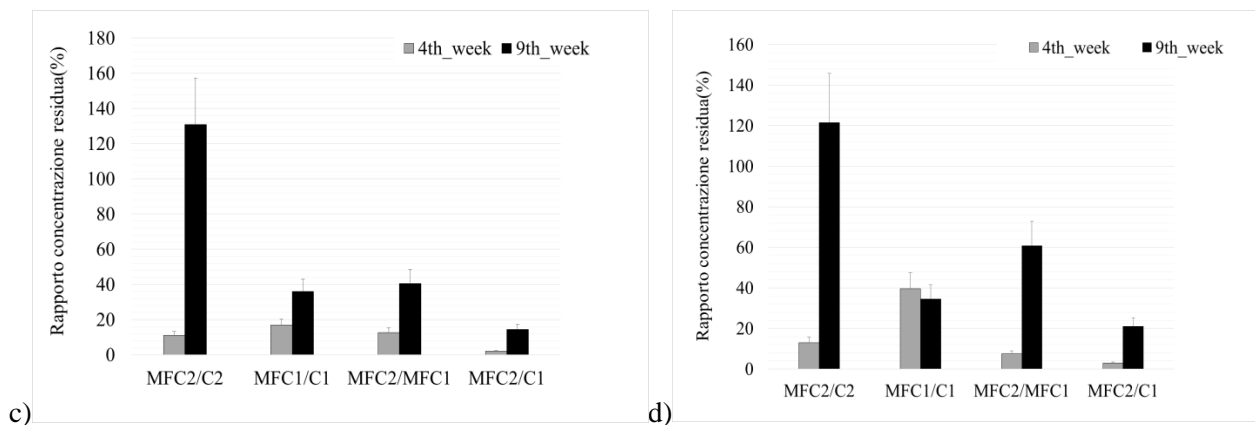


Fig.4.1.4. 4 Confronto tra le concentrazioni residue in MFC2 e in MFC1, C1 e C2.  
a) naftalene; b) fenantrene; c) pirene; d) benzo(a)pirene.

Dai grafici è confermata la significativa riduzione della concentrazione degli IPA in MFC2, rispetto agli altri campioni, dopo 4 settimane di trattamento. Infatti è stata osservata in MFC2 un'efficacia di rimozione dell'88% per pirene e del 92% per il benzo(a)pirene rispetto a MFC1. Anche rispetto a C1, in MFC2 la rimozione degli IPA più complessi risulta con un'alta efficacia di rimozione pari al 97-98%. Dopo 9 settimane, come si evince dai grafici, la concentrazione di naftalene aumentata in MFC2 rispetto a MFC1 probabilmente a causa della degradazione degli IPA più complessi. Anche le concentrazioni degli altri IPA utilizzati mostrano un aumento in MFC2 rispetto ai campioni MFC1 e C1. Questo potrebbe essere dovuto all'azione dei tensioattivi batterici. Un aumento degli IPA sopra citati, è stato osservato anche nel confronto tra MFC2 e C2 probabilmente dovuto al rilascio di IPA dal biofilm batterico, che si forma sugli elettrodi (99).

Visto la complessità degli IPA, la loro diversa capacità di interagire con la grafite mediante legami  $\pi$ - $\pi$  idrofobici(40), l'interazione complessa tra i batteri formanti biofilm, è necessario uno studio approfondito per far chiarire questi risultati.

Nella seguente tabella sono riportati i risultati relativi all'abbattimento, in termini percentuali, del TOC e COD dopo 5 settimane di trattamento per tutti e 4 i campioni.

Campione	Abbattimento TOC (%)	Abbattimento COD (%)
<b>C1</b>	0	0
<b>C2</b>	36,1	18,1
<b>MFC1</b>	39,2	21,3
<b>MFC2</b>	75	63,2

Tabella 6. Percentuale di abbattimento del TOC e COD (mg/L) per i campioni MFC1, MFC2, C1 e C2 dopo le 5 settimane di

Si può osservare una diminuzione del COD del 63% in MFC2, 21% in MFC1 e 18% in C2.

Anche per il TOC è stata riscontrata una riduzione pari 75% in MFC2, del 39% in MFC1 e appena del 36% in C2 dopo 5 settimane di trattamento. Non è stata misurata la diminuzione di TOC e COD in C1, come previsto.

#### **4.1.5. Risultati dei saggi di tossità con *Raphidocelis subcapitata***

L'endpoint indagato in questo test è 'inibizione della crescita della coltura algale, esposta a determinate concentrazioni del campione, rispetto ad una coltura di controllo. I grafici mettono in relazione la % di effetto del campione sulla crescita algale in funzione della diluizione del campione.

I dati, dopo un mese di trattamento, ottenuti dai saggi di tossicità su *R. subcapitata* condotti sui 4 campioni (MFC1, MFC2, C1 e C2) sono riportati nella Fig.4.1.5. 1 a) per l'esperimento con il consorzio specializzato, e b) per quello con il consorzio endogeno.

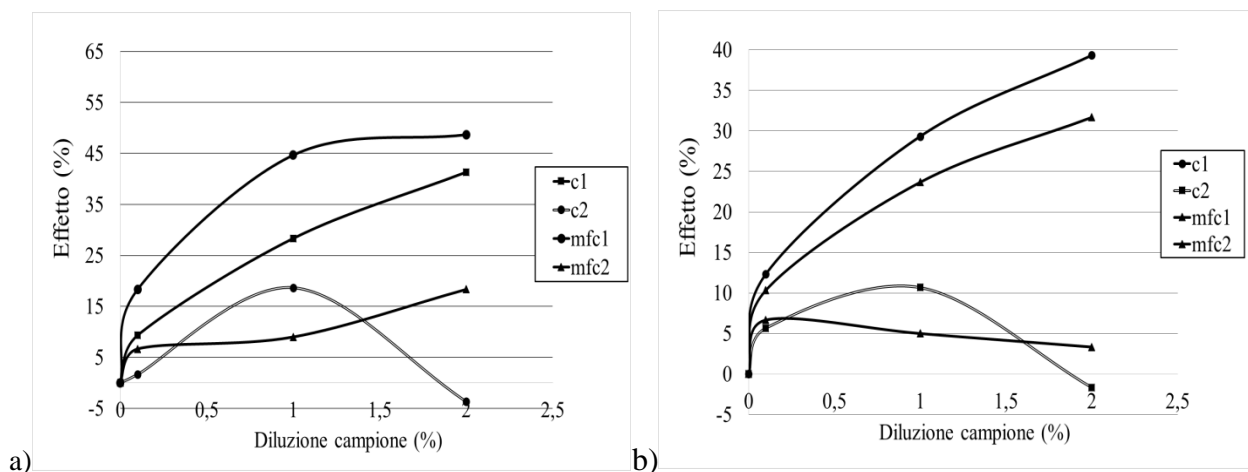


Fig.4.1.5. 1: Effetto (%) della sospensione di IPA vs *R. subcapitata* dopo un mese in MFC1, C1, MFC2 e C2 rispettivamente. I risultati sono espressi come valore medio di tre repliche. a) consorzio specializzato b) consorzio endogeno

Come si evince dai grafici, i saggi ecotossicologici per i campioni MFC2, in entrambi gli esperimenti, mostrano un livello di tossicità minore, a concentrazioni minime, e rispetto al campione MFC1 e C1,

Quindi i risultati osservati, dopo un mese di trattamento, mostrano un significativo abbassamento del livello di tossicità nel campione della cella microbica contenente il consorzio batterico rispetto al campione con solo la soluzione di IPA (C1) e al campione della cella microbica (MFC1) contenente solo la soluzione IPA e gli elettrodi. Indica questo dell'attività di desintossicazione dei batteri sul campione contaminato.

Un aspetto rilevante è la comparsa di una leggera stimolazione della crescita di *R. subcapitata* nel campione C2, in ambe due gli esperimenti. Un effetto eutrofico simile, verso *Lepidium sativum*, è stato osservato in un precedente esperimento, condotto su bioreattori con matrice suolo, impiegando lo stesso consorzio (37). Sono necessari ulteriori studi per spiegare questo effetto.



#### **4.1.6. Confronto consorzio specializzato e consorzio endogeno**

Entrambi i consorzi hanno operato nelle medesime condizioni sperimentali, in una soluzione acquosa altamente contaminata da IPA, senza fonti addizionali di energia e di carbonio (ad es. il glucosio) e senza disponibilità aggiuntiva di ossigeno.

Confrontando i risultati chimici, relativi alla rimozione degli IPA impiegati, sia per il consorzio batterico specializzato che quello endogeno, è stata osservata una significativa riduzione della concentrazione di questi composti nelle MFCs rispetto ai bioreattori. Nel dettaglio, dopo all'incirca un mese di trattamento, è stata riscontrata un'efficacia della rimozione degli IPA con valori che oscillano dal 72% al 90% per il consorzio specializzato e dell'80-90 % per il consorzio endogeno nella cella microbica con consorzio rispetto al bioreattore con il medesimo consorzio batterico. Questo è indice del ruolo dell'elettrogenesi nel migliorare i processi di degradazione microbica degli IPA. Però, in entrambi gli esperimenti, superato il mese di trattamento, vi è stato un aumento della concentrazione degli IPA in MFC con consorzio rispetto ai campioni di MFC senza consorzio e ai bioreattori. Una delle plausibili spiegazioni potrebbe essere l'azione dei tensioattivi batterici sulla solubilità degli IPA.

Comunque, conferma dell'efficacia di entrambi i consorzi nel trattamento di bioremediation con MFC, viene anche dai risultati dei saggi ecotossicologici dove si evince un notevole abbassamento del livello di tossicità nel campione della MFC con consorzio batterico, per ambo gli esperimenti, rispetto ai campioni di bioreattore (con e senza consorzio) e a quello della MFC con solo gli IPA.

In riguardo alla produzione di energia, i dati ottenuti hanno messo in evidenza la possibilità di ottenere una quantità di energia significativa nelle MFCs sia con consorzio batterico specializzato, con un picco di  $380 \mu\text{W}/\text{m}^3$  dopo 9 settimane, sia con quello endogeno, con un picco  $360 \mu\text{W}/\text{m}^3$  dopo 4 settimane di trattamento. Però la MFC con consorzio endogeno dopo 9

settimane di esperimento ha smesso di funzionare. Ulteriori indagini sono necessarie per approfondire tale comportamento.

Quindi, per entrambi gli esperimenti, la tecnologia MFC ha dimostrato di migliorare sia l'attività degradativa e detossificante del consorzio batterico impiegato nei confronti di una matrice altamente contaminata da IPA.

## 4.2.OBIETTIVO 2

### 4.2.1. Identificazione ceppi marini

E' stato possibile identificare solo le specie batteriche coltivabili e aerobiche. Dall' identificazione molecolare, dai campioni di sedimento al tempo zero e dopo un mese di trattamento nelle MFC, sono state identificate 9 diverse specie batteriche predominanti appartenenti principalmente alla famiglia delle *Bacillacea*, nel dettaglio:

- *Bacillus amyloliquefaciens*
- *Bacillus mycoides*
- *Bacillus gaemokensis*
- *Bacillus subtilis strain*
- *Bacillus licheniformis*
- *Bacillus pumilus*
- *Bacillus safensis*
- *Pseudomonas psychrotolerans*
- *Geobacillus stearothermophilum*

Nella seguente tabella sono riportate le specie batteriche isolate nei sei campioni presi in esame.

CAMPIONE	CEPPI BATTERICI	CAMPIONE	CEPPI BATTERICI
<b>T4-1</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus mycoides</i> <i>Bacillus gaemokensis</i> <i>Bacillus subtilis strain</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	<b>T5-3</b>	<i>Bacillus mycoides</i> <i>Bacillus subtilis strain</i> <i>Pseudomonas psychrotolerans</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus safensis</i>
<b>T4-2</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus mycoides</i> <i>Bacillus gaemokensis</i> <i>Bacillus subtilis strain</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	<b>T6-1</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus subtilis strain</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Pseudomonas psychrotolerans</i> <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<b>T4-5</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus subtilis strain</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	<b>T6-2</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus subtilis strain</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Pseudomonas psychrotolerans</i> <i>Geobacillus stearothermophilus</i>

Tabella 7. Ceppi batterici, isolati e identificati, e corrispettivi campioni

Come si evince dalla tabella, c'è una distribuzione abbastanza omogenea delle specie in particolar modo, in tutti i campioni è stata rilevata la *Pseudomonas psychrotolerans*.

#### 4.2.2. Analisi microbiologiche

Confrontando le analisi microbiologiche condotte sui campioni a tempo zero e su quelli prelevati dalle 6 diverse SMFC dopo un mese di trattamento, è stata rilevata la presenza di tutte le specie batteriche del consorzio impiegato, in particolare, è stata osservata una diminuzione della loro concentrazione passando da  $10^5$  UFC/g a  $10^4$  UFC/g per tutte le specie batteriche fatta eccezione per *Pseudomonas psychrotolerans* la cui concentrazione è diminuita fino a  $10^2$  UFC/g.

Dalle analisi eseguite anche sugli elettrodi, in particolar modo sull'anodo, dopo 1 mese, è stata riscontrata la presenza di diverse bacilli appartenenti al consorzio, nello specifico:

- *Bacillus amyloliquefaciens*
- *Bacillus subtilis strain*
- *Bacillus pumilus*

in concentrazioni intorno a  $10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>.

Inoltre è stata rilevata la presenza di *Pseudomonas psychrotolerans* in concentrazioni di  $10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>

### 4.2.3. Performance delle SMFCs

La performance di ciascuna cella a combustibile microbiche è stata valutata nel corso del trattamento in base alla densità di potenza (PD) e di corrente (PC).

Per tutta la durata dell'esperimento le MFC sono state mantenute alla massima potenza

Dai grafici seguenti, dove sono riportate le curve di potenza e polarizzazioni delle 6 SMFCs, si evince che le MFC hanno mostrato un buon comportamento di polarizzazione dopo solo due settimane di funzionamento (Fig.4.2.3. 1.),

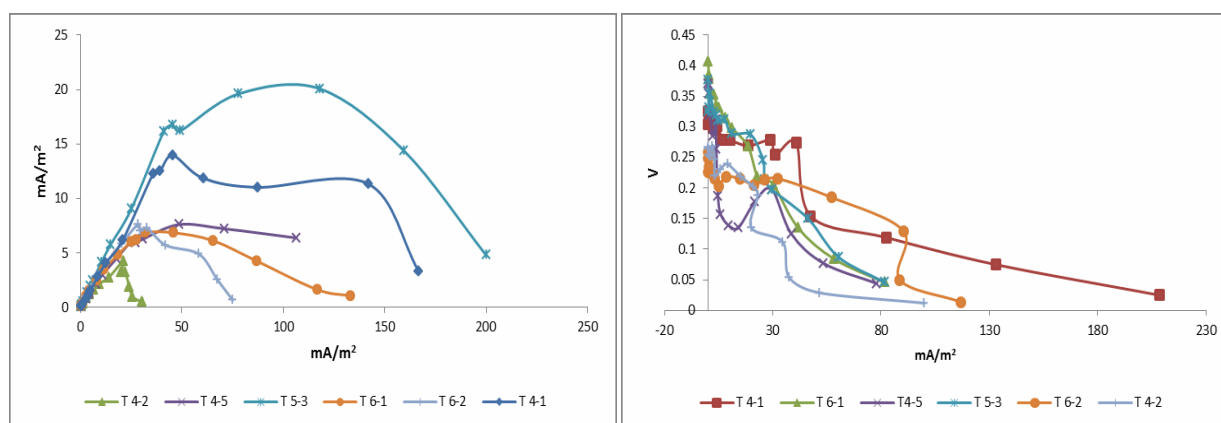


Fig.4.2.3. 1: Curve di potenza e curva di polarizzazione delle SMFCs dopo due settimane.

In termini di prestazioni, con riferimento a PD e CD, la MFC T 5-3 ha mostrata le migliori prestazioni con PD 20 mW / m² e CD 118 mA / m² di superficie anodica (1200  $\Omega$  resistenza esterna). L'unica eccezione è stata la MFC T 4-2, che con un PD di appena 4,2 mW / m² e un

CD di 21 mA / m<sup>2</sup>, ha raggiunto la massima prestazione quando è collegato a una resistenza esterna da 8000  $\Omega$ .

Dopo sei settimane, le curve di potenza hanno mostrato un doppio picco (Fig.4.2.3. 2.), la cui causa deve essere ulteriormente studiata, anche mediante analisi elettrochimiche. Tuttavia, la MFC T6-2 ha mostrato le prestazioni migliori con PD 11,7 mW / m<sup>2</sup> e CD 90,7 mA / m<sup>2</sup> (1200  $\Omega$ ) seguita dalla MFC T 4-1 con PD 10,3 mW / m<sup>2</sup> e CD 39,4 mA / m<sup>2</sup> (5600  $\Omega$ ). Tuttavia, per valutare meglio le efficienze di queste MFC, saranno effettuati calcoli di efficienza Columbica.

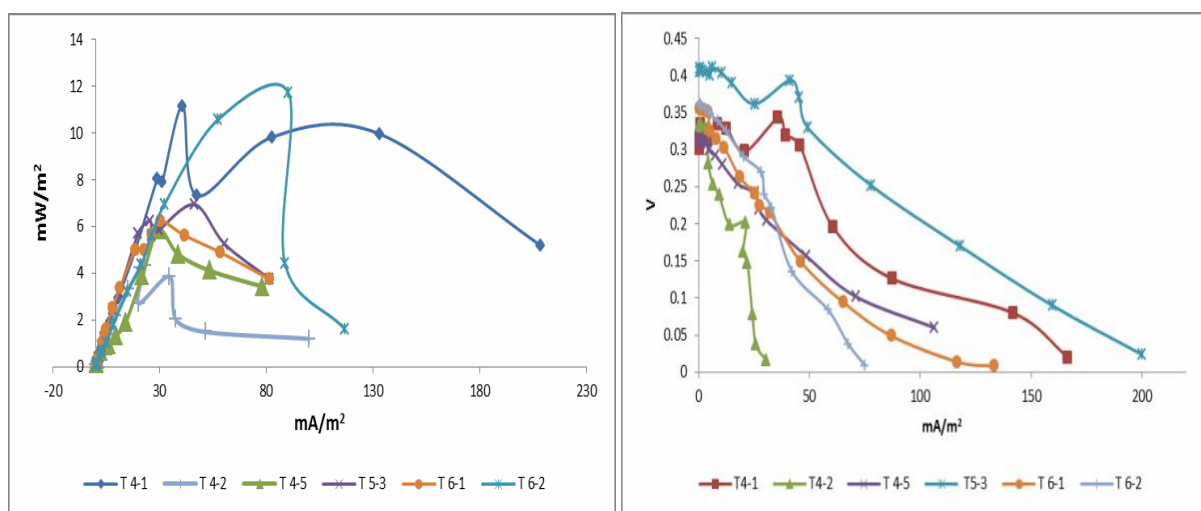


Fig.4.2.3. 2: Curve di potenza e curva di polarizzazione delle SMFCs dopo sei settimane.

#### 4.2.4. Analisi chimiche

I dati sono stati ottenuti mediante analisi con GC-MS condotte sulle sei celle microbiche T4-1, T4-2, T4-5, T5-3, T6-1 e T6-2 sia al tempo zero sia dopo 14, 21 e 28 giorni dall' inizio dell'esperimento.

Come si evince dai grafici, i risultati hanno mostrato una significativa diminuzione, quindi un ottimo grado di degradazione, delle concentrazioni dei 16 IPA dopo 28 giorni di trattamento in tutte e 6 le celle microbiche (Figg.4.2.4. 1,2,3,4,5,6.). Con la sola eccezione in MFC T6-2 (Fig.4.2.4. 6.), dove la concentrazione Fluorantrene, Benzo(a)antracene, Benzo(b)fluorantrene e Benzo(k)fluorantrene è aumentata dopo 4 settimane rispetto al tempo zero .In generale, si

osserva un andamento simile della concentrazione degli IPA nel tempo, Infatti dopo la seconda / terza settimana di esperimento si registra un aumento della concentrazione degli IPA nelle celle microbiche, ma nella quarta settimana si ha una drastica riduzione della loro concentrazione. Questi risultati possono essere facilmente spiegati con l'attività dei bio-tensioattivi, prodotti naturalmente dai ceppi microbici presenti nei sedimenti (84). I bio-tensioattivi possono aumentare la solubilità e il tasso di desorbimento degli IPA nella fase acquosa, comportandosi come agenti emulsionanti diminuendo così la tensione superficiale e formando micelle. Queste micro-gocce, prodotte e incapsulate nella superficie cellulare microbica idrofoba, vengono prelevate dalle cellule microbiche e degradate (84).

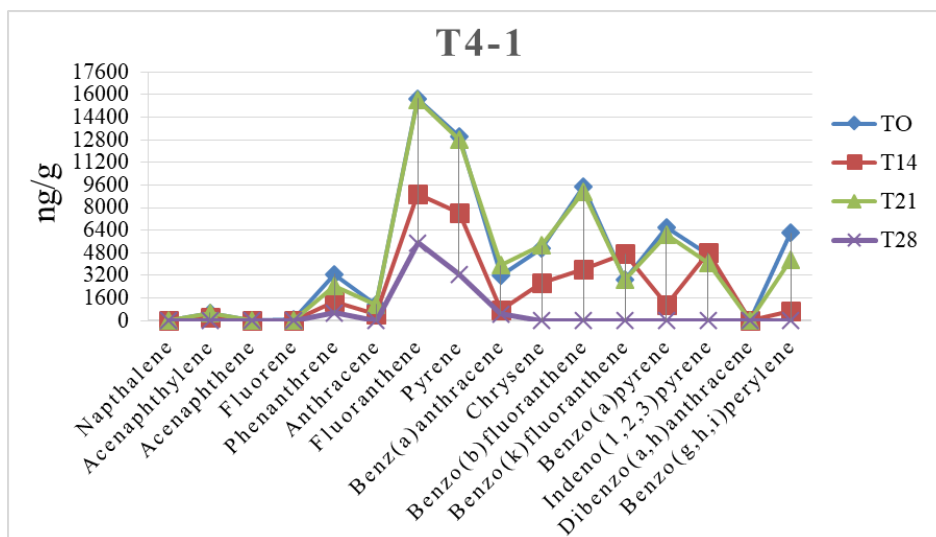


Fig.4.2.4. 1: Andamento della concentrazione dei 16 IPA in MFC T4-1

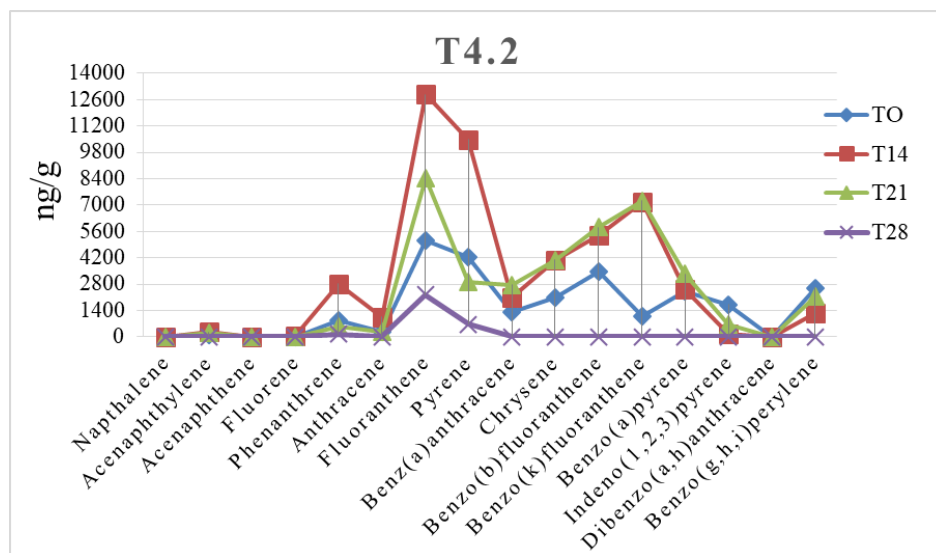


Fig.4.2.4. 2: Andamento della concentrazione dei 16 IPA in MFC T4-2

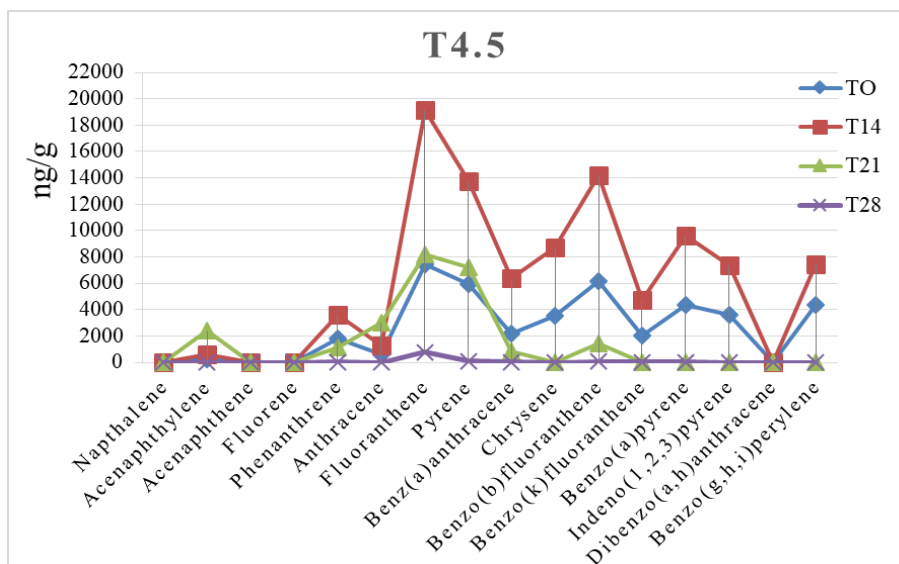


Fig.4.2.4. 3: Andamento della concentrazione dei 16 IPA in MFC T4-5

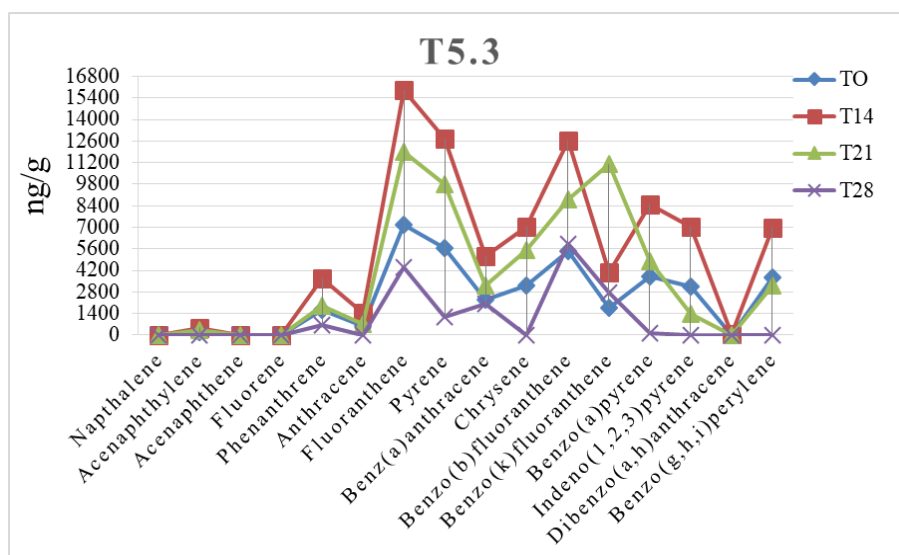


Fig.4.2.4. 4: Andamento della concentrazione dei 16 IPA in MFC T5-3

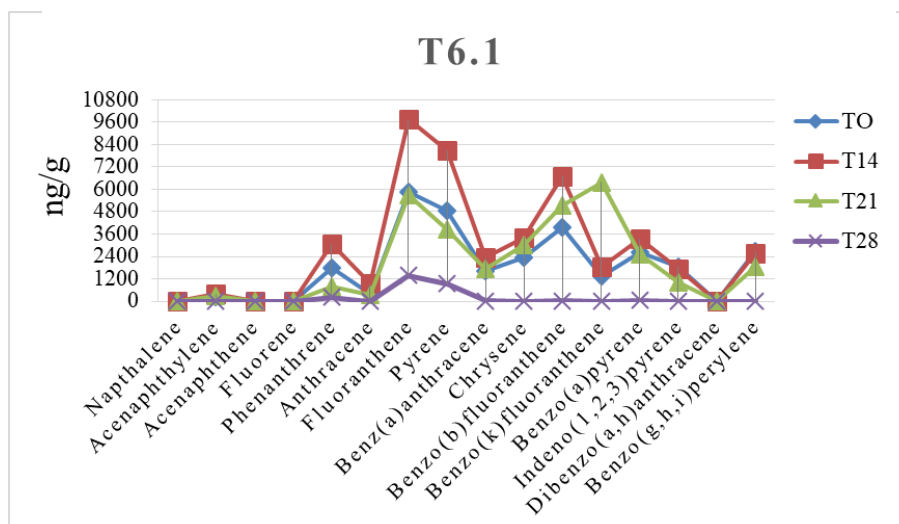


Fig.4.2.4. 5: Andamento della concentrazione dei 16 IPA in MFC T6-1



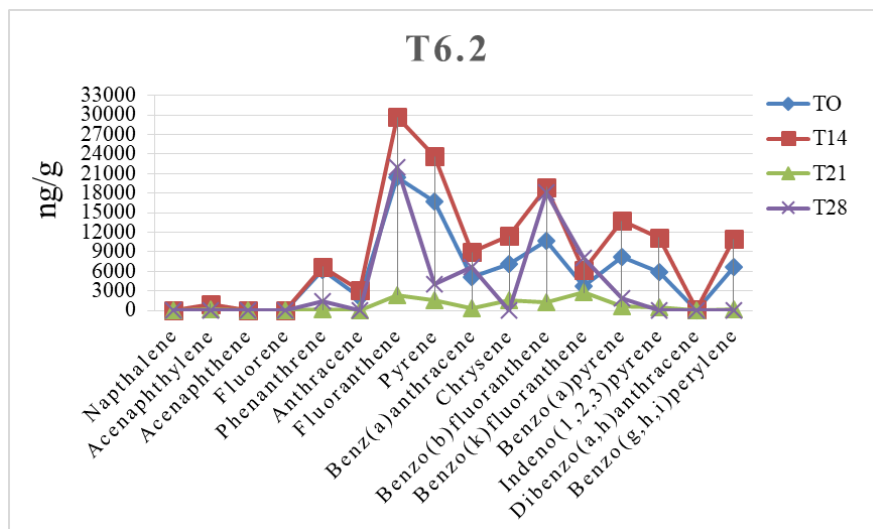


Fig.4.2.4. 6: Andamento della concentrazione dei 16 IPA in MFC T6-2

In dettaglio, prendendo in considerazione i 4 IPA di riferimento in questo studio, è stato osservato:

- Nel caso del Naftalene, le concentrazioni al tempo zero, in tutti e 6 i campioni, erano molto basse, dell'ordine medio di 5ng/g. Dopo 4 settimane si è riscontrato una rimozione del 100% in tutti i campioni
- Il Fenantrene, la percentuale di rimozione, in media, è nell'ordine del 81%, con una rimozione del 99% nella MFC T4-5.
- Un ottima rimozione è stata osservata anche per il Pirene (in media del 80%), con il massimo di 98% nella MFC T4-5
- L' IPA più complesso, il Benzo(a)pirene, è andato incontro a una notevole rimozione pari quasi al 100% in tutte le MFC ad eccezione della MFC T6-2, in cui ha mostrato una rimozione del 77%.

Questi risultati sono più significativi se consideriamo l'elevata quantità di altre sostanze chimiche (metalli pesanti innanzitutto) nei campioni selezionati che potenzialmente inibiscono l'attività microbica.

#### **4.2.5. Analisi ecotossicologiche con *Phaeodactylum tricornutum***

I dati ottenuti dai saggi di tossicità su diatomea unicellulare *Phaeodactylum tricornutum*, sono stati condotti sugli elutriati ottenuti dai campioni dei 6 sedimenti al tempo zero e dai campioni delle 6 SMFCs dopo 1 mese.

Al termine del periodo d'incubazione, in ogni coltura è stata misurata la crescita algale.

L'inibizione è stato determinato come riduzione della crescita, in termini percentuali, rispetto ad una coltura di controllo. In base alla percentuale di inibizione, si è andato a valutare la tossicità o meno del

Nel grafico di seguito, si può osservare la risposta dell'organismo alle matrici a cui è stato esposto. I valori graficati rappresentano i valori medi di tassi di inibizione di crescita misurati su tre repliche.

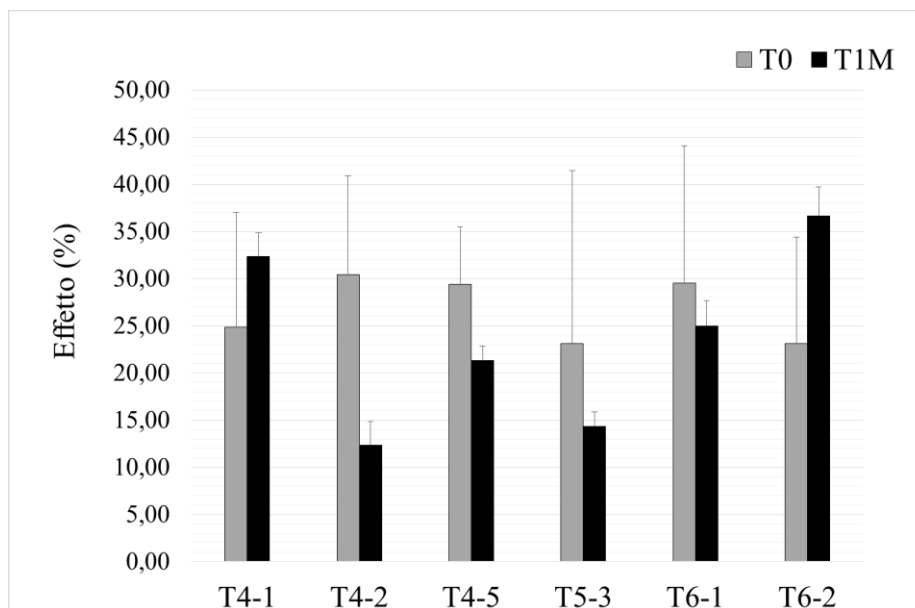


Fig. 4.2.5. 1: Inibizione di crescita(%) del elutriato vs *Phaeodactylum tricornutum*, al tempo zero e dopo un mese, nei 6 campioni di sedimento e nelle 6 MFCs rispettivamente. I risultati sono espressi come valore medio di tre repliche, riportando i valori di DS

Come si evince dal grafico, è stata riscontrata una riduzione della tossicità nei campioni T4-2, T4-5, T5-3 e T6-1 dopo un mese di trattamento nelle MFC. Ad eccezione dei campioni T4-1 e T6-2, che mostra un aumento di tossicità rispetto al tempo T zero. Nel campione T6-2, ciò probabilmente è dovuto alla presenza, in concentrazioni maggiori, di IPA complessi, come il benzo(a)antracene, risultanti tossici per gli organismi acquatici. Nel campione T4-1, potrebbe essere dovuta la formazione di intermedi, dovuti alla degradazione microbica degli IPA, risultanti tossici.

Questi risultati incoraggianti potrebbero portare all' utilizzo dei ceppi batterici, isolati dai sedimenti marini impiegati nel sudetto studio, come consorzio microbico specializzato per bonificare, tramite MFC, siti marini contaminati da IPA.

## 5. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nel corso del lavoro di tesi hanno messo in luce la capacità delle celle a combustibile microbica nei processi di bonifica di siti altamente contaminati da idrocarburi policiclici aromatici. Infatti, l'alto tasso di degradazione degli IPA, messo in evidenza dalle analisi chimiche dopo il trattamento di bioremediation, e la presenza della maggioranza dei ceppi batterici alla fine del trattamento, sono indici emblematici dell'efficacia della cooperazione tra ceppi microbici differenti. Anche i risultati dei saggi ecotossicologici dimostrano un'efficacia del trattamento di bioremediation con MFC. Infatti si evince un generale abbassamento del livello di tossicità durante il periodo di trattamento con MFC, indice di una buona efficienza nel detossificare i campioni contaminati da IPA. Inoltre, a questi risultati, va aggiunto la produzione di energia elettrica da parte delle MFC, tenendo in considerazione i possibili risvolti pratici di un'applicazione in campo di tali tecnologie nei processi di biorisanamento. Tra i possibili vantaggi nell'applicazione della tecnologia delle celle a combustibile microbica al biorisanamento, vi è il minor dispendio di energia. In quanto, la maggior parte delle tecniche di bioremediation utilizzano un'ossigenazione spinta delle matrici inquinate per stimolare i processi di degradazione microbica, con considerevole dispendio energetico. Con l'applicazione, invece, della tecnica delle MFC, l'ossigenazione non è necessaria ma addirittura si ha recupero parziale di energia che può essere impiegata nel processo stesso(100).

Uno studio approfondito sul layout, sul set-up della cella, sui materiali sia della cella che degli elettrodi nonché sulla microflora, è fondamentale in vista di un'applicazione, di tale tecnologia, *in situ*. Inoltre un approccio basato sulla realizzazione di MFC forniti di multi-anodi e multi-catodi potrebbe migliorare l'efficienza delle SMFC sia in termini di PD e CD prodotta, sia di aumento della velocità di rimozione dei IPA.

In conclusione, la tecnologia delle MFC si conferma, a livello di laboratorio, come potenziale strumento per la bonifica dei sedimenti marini inquinati da IPA con concomitante recupero d'energia.

## BIBLIOGRAFIA

1. J. Masih, R. Singhvi, K. Kumar, V.K. Jain, A. Taneja, *Aerosol Air Qual Res*, 12 (2012), pp.515-525.
2. Mandal, A.K., Sarma, P.M., Dwivedi, M., Swaleh, A., Lal, B. (2007) Bioremediation of oil contaminated soil at South Santhal CTF, Mehsana, India: A case study. Proceedings of the Asia Pacific Oil and Gas Conference and Exhibition, October 30-November 1, 2007, Jakarta, Indonesia, pp: 1-13.
- 3 A.C. Menzie, B.B. Potocki, J. Santodonato, *Environ Sci Technol*, 26 (1992), pp. 1278-1284
4. Cervantes, F. J., Ana, R. M., Emilia, R. T., Ángel, G. A., Lilia, M.L. (2011) Anaerobic degradation of benzene by enriched consortia with humic acids as terminal electron acceptors. *J. Hazard. Mater.*, 195(0):201–207.
5. Wang X, Cai Z, Zhou Q, Zhang Z, Chen C., 2011. Bioelectrochemical stimulation of petroleum hydrocarbon degradation in saline soil using U-tube microbial fuel cells. MOE Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, No. 94 Weijin Road, Nankai District, Tianjin 300071, China; telephone: 86-22-23507800; fax: 86-22-23501117.
6. E. Gambino, M. Toscanesi, F. Del Prete, F. Flagiello, G. Falcucci, M. Minutillo, M. Trifuoggi, M. Guida, R. A. Nastro, E. Jannelli, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Degradation and Detoxification of Water Environment in Single-chamber Air-cathode Microbial Fuel Cells (MFCs), *Fuel Cells*, DOI: 10.1002/fuce.201700124
7. Abbas S. Z., Rafatullah M., Ismail N., Nastro R.A. 2017. Enhanced bioremediation of toxic metals and harvesting energy through sediment microbial fuel cell. *International Journal of Energy Research*. 1-11
8. J. Masih, A. Masih, A. Kulshrestha, R. Singhvi, A. Taneja *J Hazard Mater*, Characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons in indoor and outdoor atmosphere in the North central part of India, *Journal of Hazardous Materials* 177 (2010), pp. 190-198
9. A.K. Haritash, C.P. Kaushik, 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. Department of Environmental Science & Engineering, Guru Jambheshwar University of Science & Technology, Hisar, Haryana, India.
10. M. Akyuz, H. Cabuk, *Sci Total Environ*, 408 (2010), pp. 5550-5558 Gas-particle partitioning and seasonal variation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere of Zonguldak, Turkey
11. Coates, J D., Chakraborty, R., McInerney, M. J. (2002) Anaerobic benzene biodegradation—a new era. *Res. in Microbiol.*, 153:621-628

12. Johnson, S.J., Woolhouse, K.J., Prommer, H., Barry, D.A., Christofi, N. (2003) Contribution of anaerobic microbial activity to natural attenuation of benzene in groundwater. *Eng. Geol.* 70:343–349.
13. Liu, S., Luo, Y., Cao, Z., Wu, L., & Ding, K., 2004. Degradation of benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. *Environmental Geochemistry and Health* 26, 285-293
14. Kaushik C.P., Haritash A.K., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and environmental health, *Our Earth* 3.
15. N.E. Kaminski, B.L. Faubert Kaplan, M.P. Holsapple (7th ed.)Curtis D. Klaassen (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology, the basic science of poisons, vol. 526, Mc-Graw Hill, Inc (2008)
- 16 Cerniglia C. E, & Heitkamp M.A. , 1989 . Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In: Varanasi, U (Ed.), *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. CRC Press, Boca Raton, 42-64
17. Dippler A. ,& Bigger C.A.H., 1991. Mechanism of action of food associated polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogenes. *Mutation Research* , 259: 263-276.
18. Youngblood W.W. & Blumer M., 1975. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment: homologous series in soils and recent marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 39:823-827
19. J Viguri et al. *Chemosphere* 48 (2), 157-165. 7 2002. more, Environmental Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Surface Sediments of the Santander Bay, Northern Spain
20. C. Dong, C. Chen, C. Chen *Int J Environ Res Public Health*, 9 (2012), pp. 2175-2188
21. Cerniglia C.E., (1992). Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Biodegradation*, Vol. 3: 351–368.
22. Haritash A. K., Kaushik C.P., (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 169, 1–15.
23. Lei L, Khodadoust AP, Suidan MT, Tabak HH. Biodegradation of sediment-bound PAHs in field-contaminated sediment. *Water Res.* 2005;39(2-3):349–361.
24. Riffaldi, R., Minzi, R.L., Cardelli, R., Palumbo, S., Saviozzi, A. (2006) Soil biological activities in monitoring the bioremediation of diesel oil contaminated soil. *Water, Air and Soil Poll.*, 170:3-15
25. Pokethitiyook, P, Sungpetch, A, Upathame, S., Kruatrachue, M. (2003) Enhancement of *A. calcoaceticus* in biodegradation of Tapis crude oil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42:1–10.
26. Davies J.I. & Evans W.C. 1964. Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonas. The ring fissioning mechanism. *Bioche J*, 91: 251-266.

27. Samanta S.K., Singh O.V., Jain R.K., (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnology*, Vol. 20: 243–248
28. Mahaffey W.R., Gibson D.T., Cerniglia C.E., (1988). Bacterial oxidation of chemical carcinogens: formation of polycyclic aromatic acids from benz[a]anthracene. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 54: 2415–2423.
29. Nilanjana D., Chandran, P. (2011) Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotech. Res. Intern.*, 1-13.
30. Juana, B.E, Sarina, J.E., Daniel, P.Y C., Edward, D.S. (1998) *Bioremediation principles* McGraw – Hill publisher pp.122-135
31. Chakraborty, R., Susan, M.O., Emily, C., Coates, J.D. (2005) Anaerobic Degradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene Compounds by *Dechloromonas* Strain RCB. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(12):8649–8655
32. Gibson J. & Harwood C., 2002. Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu Rev Microbiol*, 56:345-369.
33. Johnsen, A. R., Lukas, Y. W, Hauke, H. (2005) Principles of microbial PAH degradation in soil. *Environ. Poll.* 133:71-84
34. Yudono, B., Muhammad, S., Sabaruddin K., Napoleon, A., Zainal, F. (2011) Kinetics Approach of Biodegradation of Petroleum Contaminated Soil by using Indigenous Isolated Bacteria. *J. Trop. Soils*, 16(1):33-38
35. Nikolopoulou, M., Pasadakis, N., Kalogerakis, N. (2007) Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic Fertilizers. *Desalination*, 21:286–295.
36. McConkey BJ, Duxbury CL, Dixon DG, Greenberg BM. ,1997. Toxicity of a PAH photooxidation product to the bacteria *Photobacterium phosphoreum* and the duckweed *Lemna gibba*: effects of Phenanthrene and its primary photoproduct, Phenanthrenequinone. *Environmental Toxicology and Chemistry*.:892–899.
37. Nastro R.A., Suglia A., Pasquale V., Toscanesi M., Trifuoggi M., Guida M., 2014. Efficiency Measures of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Bioremediation Process Through Ecotoxicological Tests. *International Journal of Performability Engineering*, Vol. 10, No. 4, June, 2014, 411-418
38. Boscolo R., Cacciatore F., Giovanardi O., (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in transplanted Manila clams (*Tapes philippinarum*) from the Lagoon of Venice as assessed by PAHs/shell weight index: A preliminary study. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 55: 485–493.

39. Bulder, A. S., Hoogenboom, L., Kan, C. A., van Raamsdonk, L., Traag, W., & Bouwmeester, H. 2006. Initial Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Feed (material). Netherlands: Institute of Food Safety.;
40. Tsutomu Shimada, 2006. Xenobiotic-Metabolizing Enzymes Involved in Activation and Detoxification of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Department of Chemical Biology, Osaka City University Medical School.
41. Okajima T., Shirakawa Y., Hashikawa A., (2002). On the reaction of mutagenic a $\bar{a}$  toxin B1 oxide and benz[a]pyrene diol oxide with guanine residue in DNA double helix. *Journal of Molecular Structure Theochem*, Vol. 581:157–166.
42. K.H. Jung, J.K. Kim, J.H. Noh, J.W. Eun, H.J. Bae, M.G. Kim, et al. Characteristic molecular signature for the early detection and prediction of polycyclic aromatic hydrocarbons in rat liver *Toxicol Lett*, 216 (1) (2013), pp. 1-8
43. B.H. Chen, Y.S. Lin *J Agric Food Chem*, 45 (1997), pp. 1394-1403
44. P.B. Bach, M.J. Kelley, R.C. Tate, D.C. McCrory *Chest*, 123 (2003), pp. 72-82
45. Scott W. Burchiel<sup>2</sup> Michael I. Luster<sup>b</sup>. Signaling by Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Human Lymphocytes, *Clinical Immunology* Volume 98, Issue 1, January 2001,
46. Fakhru'l-Razi A1, Pendashteh A, Abdullah LC, Biak DR, Madaeni SS, Abidin ZZ., review of technologies for oil and gas produced water treatment., *J Hazard Mater*. 2009 Oct 30;170(2-3):530-51.
47. Lundstedt, S. (2003) Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remedial processes. *Solfjodern Offset AB, Umea, Sweden*, p.55.
48. Rico-Martínez, R., Terry, W. S., Tonya, L. S. (2013) Synergistic toxicity of Macondo crude oil and dispersant Corexit 9500A® to the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera) *Environ. Poll.*, 173:5–10.
49. Riser-Robert, E. (1998) Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical and chemical processes CRC press, Florida, USA. pp.8-10.
50. Boesch, M.E., Vadenbo, C., Saner, D., Huter, C., Hellweg, S. (2014) An LCA model for waste incineration enhanced with new technologies for metal recovery and application to the case of Switzerland. *Waste Manage.*, 34:378–389.
51. Godleads Omokhagbor Adams,, Prekeyi Tawari Fufeyin, Samson Eruke Okoro, Igelenyah Ehinomen, *Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review*, IJEBB, 2015
52. Chang, B.V., Shiung, L.C., Yuan S.Y. (2002) Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. *Chemosphere*, 48:717-724.



53. Anjana Sharma, Poonam Kumar, Meenal Budholia Rehman, Biodegradation of Diesel Hydrocarbon in Soil by Bioaugmentation of *Pseudomonas aeruginosa*: A Laboratory Scale Study, *Bioresource Technology*, 74. 63-67. 2000.
- 54 Evans, M.G., Furlong, C.J. (2003) *Environmental biotechnology theory and application*. John Wiley & Sons Ltd, Sussex, UK.
- 55 Khan, F., Husain, T., Hejazi, R. (2004) An Overview and Analysis of Site Remediation Technologies. *J. Environ. Managt.*, 71(2):95-122.
- 56 Tiwari Garima and Singh SP, Application of Bioremediation on Solid Waste Management: A Review, *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 2014
57. Di Molfetta A., Sethi R., Clamshell excavation of a permeable reactive barrier (abstract), in *Environmental Geology*, 50 (3), 2006, pp. 361-369, DOI:10.1007/s00254-006-0215-3.
58. Yeung, A. T., Gu, Y-Y. (2011) A review on techniques to enhance electrochemical remediation of contaminated soils. *J. Hazard. Mater.*, 195:11-29.
- 59 K.S.JørgensenJ.Puustinen1A.-M.Suortti, Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles, *Environmental Pollution* Volume 107, Issue 2, February 2000
- 60 Cassidy, D.P., Hudak, A.J. (2002) Microorganism selection and performance in bioslurry reactors treating PAH-contaminated soil. *Environ. Technol.*, 9:1033-1042.
61. Hawkes, F. R., Kim, J., Kyazze, G., Premier, G. C, Guwy, A. (2010) Feedstocks for BES conversions. In: Rabaey, K., Angenent, L. T., Shroeder, U., Keller, J. *Bioelectrochemical systems: From extracellular electron transfer to biotechnological application*. London: IWA Publishing, pp. 369-388.
62. Rabaey, K, Angenent, L.T, Schröder, U., Keller, J. (2009) *Bioelectrochemical systems: from extracellular electron transfer to biotechnological application*. IWA Publishing, London.
63. Kim B. H., Chang I. S., Gadd G. M., 2007. Challenges in microbial fuel cell development and operation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76(3): 485-494.
64. Potter, M.C. (1911) Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 84:260-276.
65. Logan B.E., (2008). *Microbial Fuel Cells*. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.
66. Kim, B.H., Chang, I. S., Cheol, Gil, G., Park, H. S., Kim, H. J. (2003) Novel BOD (biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell. *Biotech. Letters*, 25(7):541-545.

67. Abbas S. Z., Rafatullah M., Ismail N., Nastro R.A., Enhanced bioremediation of toxic metals and harvesting energy through sediment microbial fuel cell. *International Journal of Energy Research* 2017, 1-11.
- 68 Luo, Y., Liu, G., Zhang, R., Zhang, C. (2010) Power generation from furfural using the microbial fuel cell. *J. Power Sources*, 195:190-194.
69. Jannelli, N., Nastro, R.A., Minutillo, M., Guida, M., Trifuoggi, M., Andreassi, L., Facci, A.L., Krastev, V.K. and Falcucci, G., 2017. Performance evaluation of Microbial Fuel Cells fed by solid organic waste: parametric comparison between three generations. *Energy Procedia*, 105, pp.1102-1108.
- 70 Nastro R.A. Microbial fuel cells in waste treatment: recent advances. *International Journal of Performability Engineering*; 2014. 10 (4); pp.367-376.
71. Logan B.E., Regan J.M., (2006). Microbial fuel cells: Challenges and applications. *Environmental Science & Technology*, Vol. 40: 5172-5180.
72. Dos Santos, A.B., Bisschops, I.A.E., Cervantes, F.J., Van Lier, J.B. (2004) Effect of different redox mediators during thermophilic azo dye reduction by anaerobic granular sludge and comparative study between mesophilic (30°C) and thermophilic (55°C) treatments for decolourisation of textile wastewaters. *Chemosphere*, 55:1149-1157
73. Bonanni, P.S., Massazza, D., Busalmen, J.P. (2013) Stepping stones in the electron transport from cells to electrodes in *Geobacter sulfurreducens* biofilms. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15:10300–10306
74. Venkataraman, A., Rosenbaum, M. A, Perkins, S. D, Werner, J. J, Angenent, L. T. (2011) Metabolite-based mutualism between *Pseudomonas aeruginosa* PA14 and *Enterobacter aerogenes* enhances current generation in bioelectrochemical systems. *Energy Environ Sci.*, 4:4550–4559.
75. Yates, M. D., Kiely, P. D., Call, D. F., Rismani-Yazdi, H., Bibby, K., Peccia, J., Regan, J. M., Logan, B. E (2012) Convergent development of anodic bacterial communities in microbial fuel cells. *ISME J.*, 6:2002–2013.
76. Rozendal, R.A., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J. (2006) Effects of membrane cation transport on pH and microbial fuel cell performance. *Environ. Sci. Technol.*, 40(17):5206-521
77. Nastro, R.A., Falcucci, G., Minutillo, M. and Jannelli, E., 2017. Microbial Fuel Cells in solid waste valorization: trends and applications. In *Modelling Trends in Solid and Hazardous Waste Management* (pp. 159-171). Springer Singapore.
- 78- Li, J., Fu, Q., Liao, Q., Zhu, X., Ye, D.D., Tian, X. (2009) Persulfate: a self-activated cathodic electron acceptor for microbial fuel cells. *J. Power Sources*, 194:269–274

79. Yang, J.G., Liu, X., Long, T., Yu, G., Peng, S., Zheng, L. (2003) Influence of nonionic surfactant on the solubilization and biodegradation of phenanthrene. *J. Environ. Sci.*, 15:859-862.
80. Donovan, C., Dewan, A., Heo, D., Beyenal, H. (2008) Batteryless, wireless sensor powered by a sediment microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol.*, 42(22):8591-8596.
81. Chandrasekhar, K., Venkata Mohan, S. (2012) Bioelectrochemical remediation of real field petroleum sludge as an electron donor with simultaneous power generation facilitates biotransformation of PAH: Effect of substrate concentration. *Bioresour. Technol.*, 110:517-525.
82. Aelterman, P., Rabaeys, K., Pham, H.T., Boon, N., Verstraete, W. (2006) Continuous electricity generation at high voltages and currents using stacked microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.*, 40(10):3388-3394
- 83 Zhang, Y., Angelidaki, I. (2012) Self-stacked submersible microbial fuel cell (SSMFC) for improved remote power generation from lake sediments. *Biosens. & Bioelectron.*, 35(1):265-270.
- 84 Nilanjana D. and Preethy C. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, 2011, Article ID 941810, 13 pages. doi:10.4061/2011/941810.
85. Liu, H., Logan, B.E. (2004) Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Env. Sci. Technol.* 38:4040–4046
- 86 Wang, X., Cai, Z., Zhou, Q., Zhang, Z., Chen, C. (2012b) Bioelectrochemical stimulation of petroleum hydrocarbon degradation in saline soil using U-tube microbial fuel cells. *Biotech. and Bioeng.*, 109:426-433
- 87 Tong, Y., He, Z. (2013) Nitrate removal from groundwater driven by electricity generation and heterotrophic denitrification in a bioelectrochemical system. *J. Hazard. Mater.*, 262:614–619.
- 88 Amit Masih, Ajay Taneja, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) concentrations and related carcinogenic potencies in soil at a semi-arid region of India, *Chemosphere*, Volume 65, Issue 3, October 2006, Pages 449-456
89. Cui J1, Wang X, Tang J., Application of microbial fuel cell (MFC) in solid waste composting, *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2012 Mar;28(3):295-304
90. E. Gambino, R. A. Nastro, M. Trifuoggi, M. Guida, Proceedings of BioMicroWorld 2015 Conference, Barcelona, Spain, 2015.
91. Trifuoggi M., Donadio C., Mangoni O., Ferrara L., Bolinesi F., Nastro R.A., Stanislao C., Toscanesi M., Di Natale G., Ferrara L. Distribution and enrichment of trace metals in surface marine sediments in

the Gulf of Pozzuoli and off the coast of the brownfield metallurgical site of Ilva of Bagnoli (Campania, Italy). Marine Pollution Bulletin. 2017 In press.

92. Arienzo, M., Donadio, C., Mangoni, O., Bolinesi, F., Stanislao, C., Trifuoggi, M., Toscanesi, M., Di Natale, G., Ferrara, L., 2017. Characterization and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs) in the sediments of gulf of Pozzuoli (Campania, Italy). Mar. Pollut. Bull.

93. De Vivo B., Lima A., chapter fifteen – characterization and remediation of a brownfield site: the Bagnoli case in Italy, Environmental Geochemistry Site Characterization, Data Analysis and Case Histories 2008, Pages 355–385

94. Devanita Ghosh a,b, Joyanto Routh a,†, Punyasloke Bhadury b Characterization and microbial utilization of dissolved lipid organic fraction in arsenic impacted aquifers (India), Journal of Hydrology 527 (2015) 221–233

95. Andrea Baker a, Joyanto Routh b,\*, Alakendra N. Roychoudhury, Biomarker records of palaeo environmental variations in subtropical Southern Africa since the late Pleistocene: Evidences from a coastal peatland, Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 451 (2016)

96. Moreno-Garrido I. et al. (2007). Sediment toxicity tests involving immobilized microalgae (Phaeodactylum tricornutum. Environ. Int., 33,481–485.

97. Sleutels, T.A., Libertus, D., Hubertus, V.M., Cees, J.N. (2011) Effect of operational parameters on Coulombic efficiency in bioelectrochemical systems. Bioresour. Technol., 102(24):11172-11176.

98. Pepprah E.S., (2008). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in aqueous media using alternating current, 2008, UMI microform.

99. Johnsen, A. R.; Wick, L. Y.; Harms, H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environmental. 510. Pollution 2005, 133 (1), 71-84. 511.

100. Wang H., Luo H., Fallgren P.H., Jin S.,. *Bioelectrochemical system platform for sustainable environmental remediation and energy generation*. Biotechnology Advances, 2015; 33: 317-34.